

- ских зеленых мартышек. // Биотехнология. 1999. ⁹ 4. С. 15 – 20.
21. Миронова Л.А., Хапчаев Ю.Х., Попова В.Д. Линия перевиваемых клеток селезенки взрослой зеленой мартышки 455, используемой для культивирования вирусов. Авт. свид. ⁹ 984214 от 22 августа 1982 г.
 22. Миронова Л.А., Хапчаев Ю.Х. Линия гетероплоидных клеток 4646; изучение, применение, перспективы. Тверь, 1995, 113 с.
 23. Миронова Л.А., Стобецкий В.И., Попова В.Д. и др. Получение и характеристика линий перевиваемых клеток органов и тканей. // Биотехнология. 2000. ⁹ 6. С. 48 – 53.
 24. Требования к перевиваемым линиям клеток, используемые для производства биологических препаратов. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. Серия технических докладов ВОЗ ⁹745. М., 1988, С. 85 – 98.
 25. Методические указания аттестации перевиваемых клеточных линий-субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов РД 42-28-10-89. М., 1989.
 26. Колышкин В.М. Состояние вакцинопрофилактики кори и эпидемического паротита в Российской Федерации на современном этапе // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2004, ⁹4. С. 8 – 10.
 27. Тихонова Н.П., Лазикова Г.Ф., Герасимова А.Г. и др. Перспективы реализации Программы ликвидации кори в России // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2005. ⁹1 С. 19 – 22.
 28. Колышкин В.М. Иммуногенез при комбинированной вакцинации против кори и эпидемического паротита взрослых отечественной ассоциированной паротитно-коревой вакциной производства МПБП НПО «Микроген» // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2004. ⁹6 С. 18 – 20.
 29. Колышкин В.М. Роль отечественных коревых вакцин в Программе элиминации кори на территории Российской Федерации // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2004. ⁹6 С. 20 – 21.
 30. Филатов Н.Н., Лыткина И.Н., Миронова В.Ф. и др. О состоянии заболеваемости корью и организации мероприятий по ее снижению в Москве // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2004, ⁹6 С. 10 – 14.

Особенности лабораторной диагностики бактериальных менингитов в условиях догоспитального применения антибиотиков

Г.В. Белошицкий, И.С. Королева

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора, Москва

Введение

Раннее применение антибиотиков оказывает существенное влияние на прогноз течения заболевания бактериальным менингитом (БМ) и его исход. Из-за тяжести клинических проявлений, постинфекционных осложнений и высоких показателей летальности антибактериальная терапия больным БМ является неотложной. При этом руководствуются эмпирическим выбором антибиотиков в отношении наиболее распространенных патогенов, до получения результатов бактериологического исследования. Правильность такой тактики, особенно при наличии характерных изменений в ликворе, подтверждена в работах зарубежных и отечественных авторов [3].

В России введение антибактериальных препаратов (пенициллина или левомицетина) больным генерализованными формами менингококковой инфекции на догоспитальном этапе регламентировано

Приказом ⁹ 375 от 23.12.98 Министерства здравоохранения Российской Федерации [1].

Вместе с тем, раннее применение антибиотиков до проведения диагностической пункции и забора крови на бактериологическое исследование резко снижает возможность выделения культуры возбудителя. Лечение антибиотиками, проводящееся амбулаторно даже в недостаточных дозах, приводит к быстрой гибели бактериальных клеток в цереброспинальной жидкости. Ценность культурального исследования спинно-мозговой жидкости после получения пациентом антибактериального препарата снижается с 70 – 85% до 50% и менее [4]. По данным некоторых исследователей, уже через 24 – 36 часов после проведения адекватной антибиотикотерапии ликвор не содержит жизнеспособных микроорганизмов, при отсутствии изменений в основных параметрах спинно-мозговой жидкости [2].

Активное догоспитальное применение антибактериальных препаратов требует изменения тактики бактериологической диагностики гнойных бактериальных менингитов, а именно более активного использования экспрессных некультуральных методов выявления этиологического агента в реакции латекс-агглютинации, встречного иммуноэлектрофореза, иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции.

Не потеряли своего значения методы серологической диагностики, которые в основном используются для ретроспективного выявления уровня антител в сыворотке крови к менингококкам серогрупп А, В, С.

Цель настоящего исследования состояла в выборе оптимальных методов проведения лабораторной диагностики бактериальных менингитов в условиях раннего догоспитального применения антибиотиков, в зависимости от концентрации антибактериальных препаратов в ликворе.

Для решения поставленной цели ставились следующие задачи:

- Определить результативность методов диагностики бактериальных менингитов в зависимости от концентрации антибиотиков в ликворе.
- Установить возможности использования культуральных и некультуральных методов диагностики бактериальных менингитов при раннем применении антибиотиков.

Материалы и методы

Работа выполнялась на базе бактериологической лаборатории Инфекционной клинической больницы № 2 г. Москвы (главный врач В.А. Мясников).

Исследовался ликвор, взятый у пациентов при поступлении в стационар с подозрением на бактериальный менингит, в котором наряду с проведением рутинной бактериологической диагностики определялось содержание антибактериальных препаратов.

Бактериологическое лабораторное исследование ликвора выполнялось по общей схеме диагностики бактериальных менингитов, с посевом материала на плотные и жидкие питательные среды («шоколадный» и сывороточный агар, 0,1% полужидкий сывороточный агар) для получения роста культуры, постановкой реакции латекс-агглютинации (РЛА) с использованием Slidex meningite-Kit 5 производства BioMerieux (Франция), бактериоскопии мазка. Результаты бактериоскопии как самостоятельного метода считались ориентировочными и при расчете эффективности методов диагностики не учитывались. Дополнительно исследовалась кровь в реакции непрямой гемагглюти-

нации (РНГА) для обнаружения специфических антител к менингококкам серогрупп А, В, С.

Для определения концентраций антибактериальных препаратов в ликворе использовался модифицированный полуколичественный метод, основанный на ингибции поверхностного роста тест-культуры на плотной питательной среде антибиотиком, растворенным в ликворе. Сравнение зоны ингибции изучаемого образца с зонами, полученными в результате действия на тест-культуру набора стандартных растворов бензилпенициллина, позволяет рассчитать содержание в спинно-мозговой жидкости антибактериальных препаратов в пенициллиновом эквиваленте (ПЭ), независимо от вида применяемых антибиотиков или их комбинаций.

Исследование выполнялось на отечественной питательной среде АГВ (агар Гивенталья-Ведьминой), произведенной в НПО «Питательные среды» (г. Махачкала). В качестве тест-культуры использовали штамм *Staphylococcus aureus*-P209, из коллекции ГНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.

Расчет содержания препарата вычисляли по стандартной кривой.

Методика определения антибиотиков в спинно-мозговой жидкости полуколичественным методом подробно описана в журнале «Клиническая лабораторная диагностика» №8, 2004.

Выявленные концентрации антибактериальных препаратов в ликворе относили к одному из четырех диапазонов:

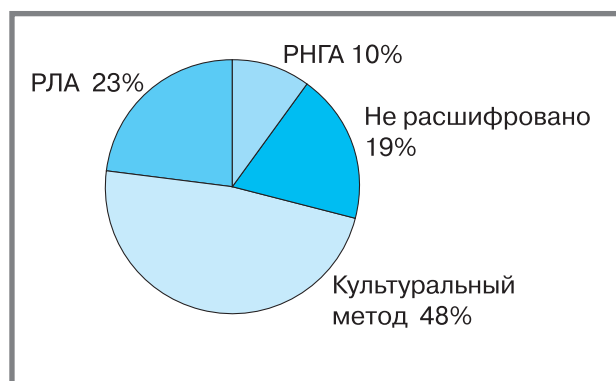
- I – от 0 до 0,1 ЕД/мл ПЭ (отсутствие или сверхмалая концентрация);
- II – до 0,5 ЕД/мл ПЭ (малые концентрации);
- III – от 0,5 до 10,0 ЕД/мл ПЭ (большие концентрации);
- IV – более 10,0 ЕД/мл ПЭ (очень значительные концентрации).

Полученные результаты бактериологической диагностики сопоставлялись с данными определения концентрации антибиотиков в первичном ликворе для определения эффективности различных методов диагностики.

Результаты и обсуждение

С апреля 2001 по июнь 2003 года нами исследовался ликвор от 575 больных (368 мужчин, 207 женщин) в возрасте от 1 мес. до 88 лет. Ликвор от больных бактериальным менингитом составлял 419 проб и 156 проб – от больных с другими диагнозами (се-

Рисунок 1.
Результативность методов диагностики
бактериальных менингитов N = 419



розные менингиты, пневмонии, сепсис, острые вирусные инфекции и др.). Выявлено, что антибактериальная активность ликвора от больных бактериальными менингитами была значимо больше ($p < 0,05$), чем в ликворе пациентов с другими диагнозами (не бактериальный менингит) во всех диапазонах концентраций.

При определении результативности методов диагностики бактериальных менингитов в качестве основного метода был выбран культуральный метод, относительно которого рассчитывалась прибавка в диагностике при использовании других методов (рис. 1).

Из 419 больных диагноз «бактериальный менингит» лабораторно подтвержден у 339 пациентов. Доля расшифрованных диагнозов с использованием всего комплекса методов составила 81%, из которых культуральный метод позволил расшифровать 48% случаев, РЛА – 23%, РНГА – 10%.

Прослеживается четкая зависимость результативности диагностики от концентрации антибиотиков в ликворе. При отрицательной антибактериальной активности ликвора (I диапазон) с использованием комплекса методов диагностики расшифровано 62%

Рисунок 2.
Эффективность различных методов диагностики
бактериальных менингитов от показателей
антимикробной активности ликвора N = 339

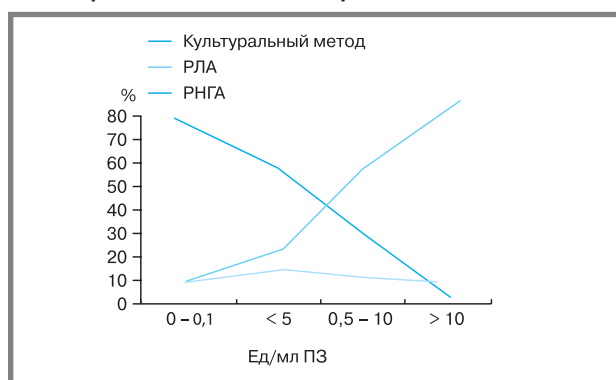
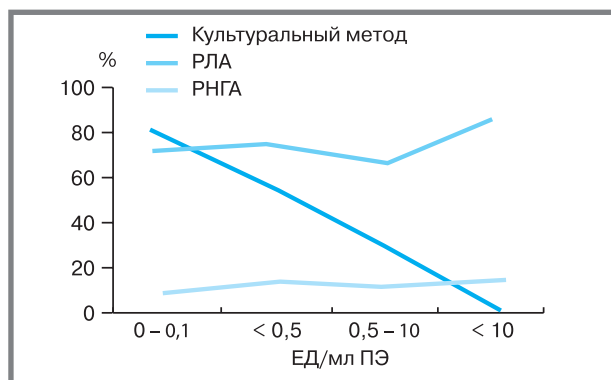


Рисунок 3.
Возможности различных методов диагностики
бактериальных менингитов
(как самостоятельных методов) N=339



случаев от числа лабораторно подтвержденных диагнозов, на другие диапазоны концентраций приходилось 11 – 14%.

Эффективность используемых методов диагностики показана на рисунке 2.

Отмечается высокая эффективность культурального метода при отсутствии или сверхмалой антибактериальной концентрации (79%) и резкое снижение эффективности метода с ростом концентраций антибиотиков в ликворе, вплоть до 2% при концентрации $>10,0$ ЕД/мл ПЭ. Напротив, эффективность РЛА с ростом концентраций антибиотиков растет. Если в I диапазоне (отсутствие или сверхмалая антибактериальная концентрация) дополнение к расшифровке диагнозов методом РЛА составляла 10%, то при концентрации $<0,5$ ЕД/мл ПЭ – 28%, при концентрации $0,5 – 10,0$ ЕД/мл ПЭ – 55%, а при концентрации $>10,0$ ЕД/мл ПЭ – 85%. Эффективность серологического метода (РНГА) практически не зависела от концентрации антибиотиков в ликворе и позволяла установить 11 – 17% случаев бактериального менингита.

Исследование возможностей различных методов диагностики как самостоятельных методов показано на рисунке 3.

Подтверждена высокая эффективность культурального метода и реакции латекс-агглютинации. Культуральный метод был наиболее результативен при отсутствии или сверхмалой антибактериальной концентрации (79%), со снижением эффективности до 56% при концентрации $<0,5$ ЕД/мл ПЭ, до 31% – при концентрации $0,5 – 10,0$ ЕД/мл ПЭ и до 2% – при концентрации $>10,0$ ЕД/мл ПЭ. Метод латекс-агглютинации позволял подтверждать диагноз бактериальный менингит в 65 – 84% случаев, с наибольшей эффективностью при значительных концентрациях ($>10,0$ ЕД/мл ПЭ) антибиотика в ликворе. При отсут-

Таблица 1.
Влияние концентрации антибиотиков на выделение культур возбудителей бактериальных менингитов

	0 – 0,1	< 0,5	0,5 – 10	> 10	Всего
N.men	98	9	1	–	108
S.pn	48	9	3	–	60
Hib	12	1	2	–	15
S.aur	4	1	4	1	10
Прочие	3	–	5	–	8
Всего	165	20	15	1	201

ствии или сверх малой антибактериальной концентрации результативность культурального метода и РЛА была одной из самых высоких, на уровне 68 – 79%. Метод РНГА позволял расшифровать только 13 – 18% случаев бактериального менингита во всех диапазонах концентраций.

Несмотря на высокую эффективность культурального метода и РЛА, ни один из них самостоятельно не позволял расшифровать все случаи менингита в любом из представленных диапазонов концентраций, наилучшие результаты достигались при совместном использовании методов.

Влияние концентраций антибиотиков в ликворе на выделение культуры возбудителей бактериальных менингитов показано в таблице 1.

Всего из ликвора выделена 201 культура возбудителей бактериальных менингитов, из которых 108 (53,7%) – менингококки, 60 (29,8%) – пневмококки, 15 (7,5%) – гемофильные палочки типа b, 18 (9,0%) – прочие возбудители (стафилококки, стрептококки, энтеробактерии, листерии, ацинетобактерии, псевдомонады). Как следует из таблицы 1, при отсутствии или сверхмалой антибактериальной концентрации выявлено 82% от общего числа выделенных культур, в том числе 91% менингококков, 80% пневмококков, 80% гемофильных палочек типа b, 39% прочих возбудителей.

В диапазоне концентраций < 0,5 ЕД/мл ПЭ получено 10% от числа выделенных культур возбудителей бактериальных менингитов. По сравнению с отрицательной антибактериальной активностью ликвора рост менингококков снизился на порядок и составил 9%, что свидетельствует об их высокой чувствительности к антибиотикам.

При отсутствии антибактериальной активности и при малых концентрациях антибиотиков в ликворе высевалось 92% всех возбудителей бактериальных ме-

нингитов, из которых 88% представлены основными возбудителями гнойных менингитов (менингококками, пневмококками, гемофильными палочками типа b).

В диапазоне концентраций 0,5 – 10,0 ЕД/мл ПЭ выделено 7% культур, преобладали *S. aureus* и «прочие» (4%), основные возбудители гнойных менингитов составили 3%, в т.ч. выделена одна культура менингококков.

При концентрации более 10,0 ЕД/мл ПЭ получен высеив только одной культуры *S. aureus*, с выраженными резистентными свойствами к пенициллину.

Вывод

Наибольшую результативность приносит комплексное использование культуральных и некультуральных методов диагностики.

С повышением концентрации антибиотика в ликворе резко возрастает эффективность некультуральных методов, однако даже при больших концентрациях препарата возможен высеив единичных культур основных возбудителей бактериальных менингитов (менингококков, пневмококков, гемофильных палочек типа b). Наиболее жизнеспособными при высоких концентрациях антибактериальных препаратов остаются *S. aureus* и «прочие» возбудители (энтеробактерии, листерии, эпидермальные стафилококки, ацинетобактерии, псевдомонады).

Внедрение полуколичественного метода определения антибиотиков в ликворе позволяет обосновать необходимость использования некультуральных методов диагностики.

Литература

1. Приказ № 375 от 23.12.98 г Министерства здравоохранения Российской Федерации «О мерах по усилению эпидемиологического надзора и профилактики менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов».
2. Bonadio W.A. The cerebrospinal fluid: physiologic aspects and alternations associated with bacterial meningitis//Pediatr. Infect. Dis. J. – 1992. – V. 11. – P. 423 – 32.
3. Oostenbrink R., Moons K.G., Twijnstra M.J., Grobbee D.E., Moll H.A. Children with meningeal signs: predicting who needs empiric antibiotic treatment//Arch. Pediatr. Adolesc. Med. – 2002, Dec. – V. 156 (12). – P. 1189 – 94.
4. Tunkel A.R., Scheld W.M. Acute meningitis. In: Mandel G.L., Bennet J.E., Dolin R., eds. Principles and practice of infectious disease, 4th ed. N. Y.: Churchill Livingstone. – 1995. – P. 831 – 55.