

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
Федеральное казённое учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт Сибири и Дальнего Востока»

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ХОЛЕРЫ**

Для врачей-бактериологов (биологов) и преподавателей



Иркутск, 2012

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
Федеральное казённое учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт Сибири и Дальнего Востока»

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ХОЛЕРЫ**

Для врачей-бактериологов (биологов) и преподавателей

Иркутск, 2012

АННОТАЦИЯ

Руководство предназначено для использования при профессиональной переподготовке врачей-бактериологов (биологов), эпидемиологов и лаборантов по основным и дополнительным профессиональным образовательным программам (свыше 500 ч), на циклах повышения квалификации по профилю программ профессиональной переподготовки по опасным инфекционным болезням (144 ч, 72 ч), подготовке специалистов по программам послевузовского образования (аспирантура по специальностям 03.02.03 «микробиология», 14.02.02 «эпидемиология»), для практической работы специалистов, занимающихся диагностикой холеры.

Руководство составили специалисты Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (**Г.Г. Онищенко, И.В. Брагина, Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, Н.В. Шеенков**), ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (**С.В. Балахонов, Л.Я. Урбанович, В.С. Ганин, Л.В. Миронова, Т.Ю. Загоскина, О.А Носкова, Е.С. Куликалова, Е.А. Басов., Л.Е. Токарева, Т.С. Тайкова, Т.М. Долгова**)

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	2
ВВЕДЕНИЕ	3
1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ..	5
ЗАНЯТИЕ 1	16
ЗАНЯТИЕ 2	17
ЗАНЯТИЕ 3	18
ЗАНЯТИЕ 4	20
ЗАНЯТИЕ 5	21
ЗАНЯТИЕ 6	23
ЗАНЯТИЕ 7	24
ЗАНЯТИЕ 8	26
2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	26
ЗАНЯТИЕ 9	34
ЗАНЯТИЕ 10	36
ЗАНЯТИЕ 11	39
ЗАНЯТИЕ 12	40
ЗАНЯТИЕ 13	43
ЗАНЯТИЕ 14	45
3. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ	45
ЗАНЯТИЕ 15	49
ЗАНЯТИЕ 16	51
4. ПРИЛОЖЕНИЕ	52
ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	52
РЕАКТИВЫ	60
КОНСЕРВАНТЫ	60
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПЛОТНЫХ И ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД	61
ПРОВЕРКА КАЧЕСТВА ТЕЛЛУРИТА КАЛИЯ	62
МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СВОЙСТВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	63
НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ И РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	88

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АК – аминокислота
ВА – вибриоцидные антитела
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
КА – контроль антигена
КРЖ – контроль разводящей жидкости
КС – контроль сыворотки
КПС – контроль питательной среды
ЛХЭД – липосомальный холерный энтеротоксический диагностикум
МПА – мясопептонный агар
МПБ – мясопептонный бульон
МПК – минимальная подавляющая концентрация
МФА – метод флюоресцирующих антител
ПВ – пептонная вода
ПЖА – полужидкий агар
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РА – реакция агглютинации
РИВ – реакция иммобилизации вибрионов
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
СИБ – система идентификации бактерий
СЭДХ – среда элективно-дифференциальная для выделения холерных вибрионов
ЭХЭД – эритроцитарный холерный энтеротоксический диагностикум
СТ (Cholera Toxin) – холерный токсин
ctxAB – гены холерного токсина
TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar) – питательная среда для выделения холерных и не O1/O139 вибрионов
TCP (Toxin-Coregulated Pilus) – токсин-корегулируемые пили адгезии

ВВЕДЕНИЕ

Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике холеры предназначено для врачей – бактериологов (биологов), специализирующихся по особо опасным инфекциям. Оно поможет курсантам методически правильно выполнить задания, изучить теоретический материал, а преподавателям – организовать подготовку материальной базы к проведению занятий.

Учебный материал рассчитан на 68 ч и распределен на 16 практических занятий, каждое из которых включает план, методические указания к выполнению заданий и перечень необходимого материала и оборудования. В приложении приведены рецепты основных питательных и дифференциально-диагностических сред, методики изучения биологических свойств вибрионов, список основной рекомендуемой литературы.

При подготовке к занятию курсанты должны самостоятельно проработать теоретические вопросы предстоящего занятия, пользуясь лекциями и специальной литературой, ознакомиться с планом работы и соответствующими методическими приемами.

Проведению занятий должна предшествовать тщательная подготовка курсантов по вопросам безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности.

Руководство разработано в соответствии с программой курсов первичной специализации врачей (биологов) по особо опасным инфекциям (свыше 500 ч), с учетом действующих санитарных правил СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», методических указаний МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального

уровней», МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры», МУ 3.1.1.2232-07 «Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры», действующих санитарных правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) и других законодательных актов и инструктивно-методических документов.

1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Холера – острая инфекционная болезнь с диарейным синдромом, фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, водным, пищевым и контактно-бытовым путями распространения инфекции.

Холерные вибрионы относятся к семейству *Vibrionaceae*, роду *Vibrio*, виду *cholerae*, который включает как патогенные, способные вызывать заболевания, склонные к эпидемическому и пандемическому распространению, так и не патогенные, безопасные для человека или обуславливающие спорадические случаи диарей. Известно более 200 O-серологических групп холерных вибрионов, из которых лишь холерные вибрионы O1 серогруппы (классического – *V. cholerae cholerae* и эльтор – *V. cholerae eltor* биоваров) и O139 серогруппы (*V. cholerae* O139) являются возбудителями эпидемической холеры (рис. 1).

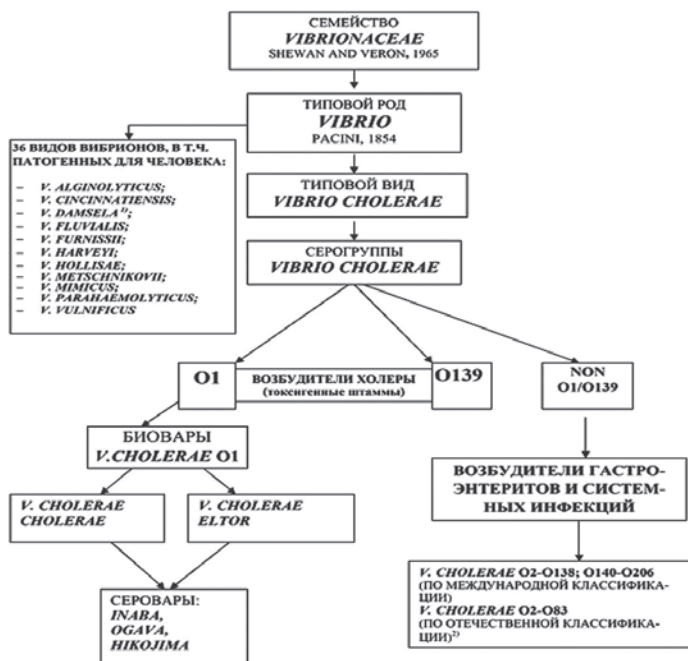


Рис. 1 Таксономия семейства *Vibrionaceae*

Примечания:

Таксономия вибрионов представлена по *Bergeys manual of Determinative Bacteriology*, 2000

1) предложено *McDonell & Colwell (1985)* отнести к новому роду *Listonella*;

2) типовые штаммы O2-O39 соответствуют таксономии *R.Sakazaki (1970)*; O40-O83, а также O12; O23 и O26 не изучены в сравнении с международной коллекцией типовых штаммов

Холерные вибрионы грамотрицательные аспорогенные полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки, варьирующие в размерах (0,2-0,6 мкм в ширину и 1,5-3,0 мкм в длину), с одним полярно расположенным жгутиком, благодаря которому очень подвижны.

Холерные вибрионы хорошо растут на щелочных питательных средах pH 7,6-8,6, Оптимальная температура выращивания – 35-38°C. На щелочных жидких питательных средах - мясо-пептонном бульоне (МПБ) и 1% пептонной воде (ПВ) – через 3-5 ч инкубирования при 37°C наблюдается образование нежной пленки на поверхности и равномерное помутнение среды. В полужидком (0,3%) агаре – равномерный рост во все стороны от укола, достигающий через 24-36 часов стенок пробирки. На пластинках щелочного мясо-пептонного агара (МПА) холерные вибрионы в типичной S-форме через 16-18 ч культивирования образуют гладкие, плоские, прозрачные, влажные с ровным краем колонии. На элективной среде TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*) на зеленом фоне среды колонии вибрионов круглые, гладкие с ровным краем, плоские, желтого цвета. Могут встречаться атипичные колонии – шероховатые (R-форма) и мукоидного типа, представляющие собой измененные формы холерного вибриона.

Холерные вибрионы, как и другие представители рода

Vibrio, ферментируют до кислоты глюкозу в аэробных и анаэробных условиях, декарбоксилируют лизин и орнитин, не обладают дигидролазой аргинина, относятся к 1 ферментативной группе Хейберга-Смита, расщепляют до кислоты сахарозу, маннозу, маннит, и не разлагают арабинозу (рис. 2а,б,в). Вибрионы разжижают желатину, казеин, фибрин; вырабатывают лецитиназу, липазу, нейраминидазу, хитиназу, пенициллиназу, индофенолоксидазу, лизин- и орнитиндекарбоксилазы, нитратредуктазу, β-галактозидазу.

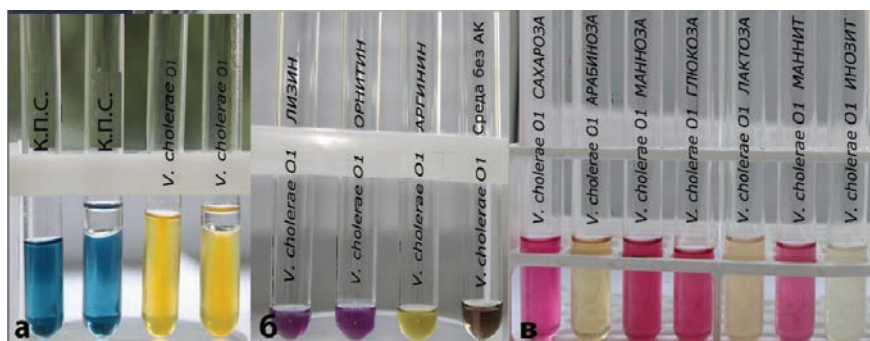


Рис. 2. а. Ферментация глюкозы *V.cholerae* в аэробных и анаэробных условиях (среда Хью-Лейфсона). б. Ферментация *V.cholerae* аминокислот лизина, орнитина и аргинина на бульоне Мюллера с аминокислотами. в. Ферментация сахаров *V.cholerae* на средах Гисса.

Холерные вибрионы обоих биоваров (*V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor*) имеют общий О-антиген, относятся к О1 серологической группе и представлены тремя сероварами: Огава, Инаба и Гикошима. Серовар Гикошима представляет собой разнопроцентную смесь сероваров Огава и Инаба.

Принадлежность культур *V. cholerae* к О1 серогруппе определяется по результатам их агглютинации видоспецифической холерной сывороткой О1. Вариантоспецифичность культуры устанавливается по результатам

РА с холерными сыворотками Огава и Инаба. Холерные вибрионы, реагирующие в одинаковых титрах с сыворотками обоих серовариантов – Инаба и Огава, относятся к серовару Гикошима. Вибрионы O139 серогруппы по своим морфологическим и биохимическим свойствам не отличаются от вибрионов O1 серологической группы. Единственным отличием является агглютинация O139 сывороткой.

Типичные штаммы холерных вибрионов в S-форме агглютинируются видо- и вариантоспецифической сыворотками не меньше, чем до 1/2 титра. Культуры в R-форме взаимодействуют с холерной RO-сывороткой, при этом агглютинация с видоспецифической холерной сывороткой O1 серогруппы снижена или отсутствует совсем.

При выделении атипичных культур проводятся дополнительные исследования. Штаммы, агглютинирующиеся диагностическими сыворотками O1, RO, Инаба, Огава ниже 1/2 титра или агглютинирующиеся только RO сывороткой (с полной или частичной утратой способности лизироваться диагностическими холерными бактериофагами) изучаются в тестах, определяющих их принадлежность к роду *Vibrio* (табл. 1).

Таблица 1

Основные дифференциальные признаки рода *Vibrio*
и некоторых других микроорганизмов

Признаки	Vibrionaceae		Aero-mona- daceae	Morax- llaceae	Photo- bacteri- ceae	Entero- bacteria- ceae		Pseudomo- nadaceae
	<i>Vibrio</i> в т. ч.		Aeromonas	Enhydro- bacter	<i>Photo- bacterium</i>	<i>Plesiomonas</i>	Другие рода	
	<i>V. chole- rae</i>	Другие виды						
1	2	3	4	5	6	7	8	9

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Окраска по Граму, морфология	Грамотрицательные полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки							
Подвижность	+	+(-)	+(-)	-	+	+	+(-)	+
Оксидаза	+	+(-)	+	+	+(-)	+	-	+(-)
Рост на средах без NaCl	+	-(+)	+	+	-	+	+	-
Чувствительность к O129 ¹⁾	+	+(-)	-	-	+	+	-	-
О/Ф глюкозы в среде Хью-Лейфсона	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
Газ из глюкозы	-	-(+)	+(-)	-	+	-	+/-	-
Лизиндекарбоксилаза	+	+(-)	-(+)	+	+	+	+/-	-(+)
Орнитиндекарбоксилаза	+	+/-	-(+)	+	+	+	+/-	-(+)
Аргининдигидролаза	-	-(+)	+	+	+	+	-/+	+/-
Ферментация: лактозы	-	-(+)	-(+)	-	X	+	+/-	-(+)
маннита	+	+(-)	+(-)	X	-	-	+(-)	+(-)
арабинозы	-	-(+)	+(-)	X	-	-	+(-)	-(+)
сахарозы	+	+(-)	+	X	-(+)	-	+/-	-
инозита	-	-(+)	-	X	-	+	-(+)	X
Образование: ацетилметилкарбинола	+(-)	-(+)	+(-)	-	+	-	-(+)	X
Индола	+	+(-)	+(-)	-	-	-	+(-)	+/-
нитрат-редуктазы	+	+(-)	+	+	+(-)	+	+	+/-
бета-галактозидазы	+	+(-)	+	X	+	+	-(+)	X
желатиназы	+	+(-)	+	X	+	-	-(+)	+/-
Биолюминесценция	-(+)	-(+)	-	X	+	-	-	-
Мол. % G + C в ДНК	38	51	57 - 63	66	40 - 44	51	39 - 59	58 - 70

¹⁾ - Бактериостатический агент 2,4-диамино-6,7-диизопропилптериоидин.

Условные обозначения:

X - нет данных;

+ - положительный результат в 90%;

- - отрицательный результат в 90%;

+/- - положительный и отрицательный результаты встречаются в равной степени;

+(-) или -(+) - в скобках редко наблюдаемый результат.

Слабо агглютинирующиеся холерной O1 сывороткой и фагорезистентные культуры подлежат исследованию в реакциях непрямой гемагглютинации (РНГА), иммобилизации вибрионов (РИВ), полимеразной цепной реакции (ПЦР), флюоресцентно-серологическим методом (МФА), или адсорбцией по Кастеллани. Культура, агглютинирующаяся сывороткой O139, относится к *V. cholerae* O139 серогруппы.

Если культура не агглютинируется холерными сыворотками O1, O139, но по совокупности признаков относится к виду холерных вибрионов, проводится ее изучение в реакции агглютинации с набором диагностических холерных сывороток O2-O83 серогрупп по отечественной классификации. Кроме того, штаммы *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп подвергают типированию бактериофагами диагностическими холерными ТЭПВ 1-7.

Энтеропатогенные холерные вибрионы не O1/O139 групп относятся преимущественно к O2, O5, O6, O8, O9, O14, O17, O22, O24, O28, O34, O36, O41, O42, O47, O50 серогруппам и, как правило, лизируются фагами ТЭПВ 1, 4, 7. Для определения принадлежности вибрионов к галофильной группе проводятся дополнительные исследования с разным процентным содержанием NaCl в питательной среде (приложение 4.6.4.).

Хранение культур вибрионов проводится в лиофи-

лизированном (высушенном) состоянии.

Основными признаками дифференциации биоваров холерных вибрионов являются проба с холерными диагностическими фагами классическим и эльтор, реакция агглютинации с куриными эритроцитами или эритроцитами морской свинки, тест на чувствительность к 50 ед/мл полимиксина В и образование ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра (рис. 3а,б,в, табл. 2).

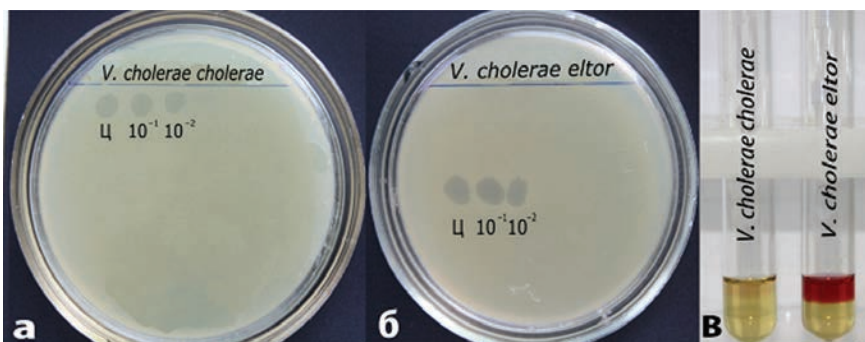


Рис. 3

- а, б.** Дифференциация биоваров *V. cholerae* O1 в пробе с холерными фагами.
в. Дифференциация биоваров *V. cholerae* O1 в реакции Фогес-Проскауэра (среда Кларка).

Таблица 2

Дифференциальные признаки биоваров *V.cholerae* O1

Признаки	Биовары	
	<i>V. cholerae cholerae</i>	<i>V. cholerae eltor</i>
Лизабельность холерными фагами: классический эльтор	+ -(+)	- +/-
Агглютинация куриных эритроцитов	-	+(-)
Чувствительность к 50 ед полимиксина В	нет роста	рост
Образование ацетилметилкарбинола	-	+(-)

Патогенные (эпидемически опасные) штаммы хо-

лерного вибриона характеризуются способностью продуцировать термо-лабильный холерный энтеро-токсин (холероген) – основной фактор вирулентности микроорганизма, кодируемый генами *ctxAB*, входящими в состав интегрированного в хромосому филаментозного бактериофага СТХ. По структуре гена субъединицы В (*ctxB*) выделяется ряд генотипов холерного токсина, в частности *ctxB1* (специфичный для классического биовара), *ctxB3* (специфичный для биовара эльтор). В последние годы обнаружены атипичные варианты вибриона эльтор с измененным геномом: фенотипически они соответствуют биовару эльтор, но содержат в геноме классическую аллель гена холерного токсина – *ctxB1*. Кроме того, эпидемически опасные штаммы холерного вибриона формируют токсин-корегулируемые пили адгезии (ТСР), играющие основную роль в адгезии и колонизации вибрионом слизистой оболочки тонкого кишечника. Биосинтез токсин-корегулируемых пилей находится под контролем кластера генов *tcr*, входящего в состав «острова патогенности» *VPI*.

Одним из основных подходов к оценке эпидемической значимости холерного вибриона является детекция генов холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей в поли-меразной цепной реакции (ПЦР): штаммы, содержащие гены *ctxAB* и *tcrA*, относятся к эпидемически опасным, а лишенные указанных генов штаммы характеризуются как эпидемически не опасные.

Метод ПЦР применяют при исследовании выделенной чистой культуры возбудителя, проб воды, испражнений больных холерой людей или сред накопления.

Оценку эпидемической значимости штаммов холерного вибриона эльтор можно провести комплексным

методом, который включает определение гемолитической активности изолятов и чувствительности к фагам СТХ⁺ и СТХ⁻ (рис. 4а,б,в, табл. 3); в ряде случаев необходимо изучение токсигенности на кроликах-сосунках (табл. 3).



Рис. 4. а. Гемолиз эритроцитов барана *V. cholerae* O1 разной эпидемиологической значимости.

б, в. Лизис *V. cholerae* СТХ⁺ и СТХ⁻ фагами.

Таблица 3

Схема оценки эпидемической значимости *V. cholerae eltor* по чувствительности к бактериофагам ctx⁺ и ctx⁻ и гемолитической активности

Группы	Варианты	Гемолиз по Грейгу	Чувствительность к фагам		Оценка эпидемической значимости
			СТХ ⁺	СТХ ⁻	
I	1	-	+	-	эпидемически опасны
II	2	-	-	-	для оценки эпидемической значимости необходимы дополнительные исследования на наличие генов ctxAB, tcrA или определение холерогенности на кроликах-сосунках
	3	-	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	-	
III	6	+	-	+	эпидемически не опасны
	7	+	-	-	
	8	-	-	+	

Токсигенные (продуцирующие холерный токсин)

штаммы вызывают гибель в течение первых двух суток с типичным «синдромом холерогенности» кроликов-сосунков после внутрикишечного введения культуры холерного вибриона в дозах 1×10^5 и 1×10^7 м.к.

Штаммы холерного вибриона, не продуцирующие холерный токсин, не вызывают гибели животных и изменений в кишечнике или обуславливают накопление в кишечнике животных мутной, коричневатой-желтой жидкости, т.е. развитие энтеропатогенного синдрома, связанного с действием других факторов патогенности.

Обязательной проверке на модели кроликов-сосунков в отсутствие возможности определения гена холерного токсина подлежат следующие штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп:

а) выделенные от людей:

гемолитнегативные штаммы холерного вибриона O139 серогруппы;

гемолитпозитивные штаммы холерных вибрионов обеих серогрупп;

гемолитотрицательные штаммы холерного вибриона O1 серогруппы, атипичные по серологическим свойствам и устойчивые к фагу эльтор и СТХ +

б) выделенные из объектов окружающей среды:

гемолитотрицательные штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенные при отсутствии эпидемических осложнений по холере.

Для полной характеристики штаммов проводится исследование чувствительности к антибиотикам (табл. 4).

Определение антибиотикограммы холерных вибрионов, выделенных от первых больных, необходимо проводить методом серийных разведений, поскольку этот метод позволяет определять не только высокую чувствительность или высокую степень резистентности культур к антибактериальным пре-

паратам, но и выявлять промежуточные значения минимально-подавляющей концентрации (МПК) препарата. Диско-диффузионный метод используется как ориентировочный при изучении чувствительности к антибактериальным препаратам последующих культур холерного вибриона.

Таблица 4

Пограничные значения диаметров зон ингибиции роста (мм) и величин мпк (мкг/мл) антибиотикобактериальных препаратов для рода *vibrio*

Антибактериальный препарат	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
Доксициклин	10	і 19	J 17	J 2,0	і 4,0
Тетрациклин	30	і 19	J 17	J 4,0	і 8,0
Левомецитин	30	і 23	J 19	J 4,0	і 16,0
Налидиксовая кислота	30	і 20	J 18	J 4,0	і 16,0
Ципрофлоксацин	5	і 25	J 19	J 0,1	і 1,0
Офлоксацин	5	і 25	J 15	J 0,1	і 1,0
Пефлоксацин	10	і 22	J 16	J 0,1	і 1,0
Норфлоксацин	10	і 22	J 19	J 0,1	і 1,0
Ломефлоксацин	10	і 22	J 19	J 0,1	і 1,0
Левифлоксацин	5	і 22	J 19	J 0,1	і 1,0
Рифампицин	5	і 20	J 13	J 4,0	і 16,0
Стрептомицин	30	і 15	J 12	J 16,0	і 32,0
Гентамицин	10	і 16	J 12	J 4,0	і 8,0
Канамицин	30	і 17	J 15	J 16,0	і 32,0
Амикацин	30	і 17	< 15	J 8,0	і 16,0
Тобрамицин	10	і 17	< 12	J 4,0	і 16,0
Нетилмицин	30	і 19	< 17	J 4,0	і 8,0
Ампициллин	10	і 17	J 13	J 4,0	і 16,0
Цефотаксим	30	і 25	< 15	J 1,0	і 4,0
Цефтриаксон	30	і 25	< 15	J 1,0	і 4,0
Фуразолидон	300	і 18	< 15	J 4,0	і 16,0
Триметоприм/сульфаметоксазол	1,25/ 23,75	і 20	< 15	J 2,0/38,0	і 8,0/152,0

Примечание: S* - чувствительный; R* - устойчивый

Занятие 1

Изучение культурально-морфологических и биохимических свойств *V. cholerae cholerae*, *V. cholerae eltor* и *V. cholerae O139*

Приготовление мазков и окраска их по Граму.

Посев агаровых культур секторами на одну чашку МПА, селективные среды (TCBS, Монсура, СЭДХ (среда элективно-дифференциальная для выделения холерных вибрионов) и др.), пробирки со скошенным МПА, лактозо-сахарозной средой, МПБ, 1% ПВ, 0,3% полужидким агаром (ПЖА), средами Гисса с сахарозой, маннозой, арабинозой, крахмальной средой с индикатором Андреде и желатиной.

Определение подвижности вибрионов в препарате «раздавленная капля» в поле зрения светового и фазово-контрастного микроскопов.

Посев смеси культур холерного вибриона и кишечной палочки секторами на МПА и селективные среды.

Примечание: Все посе́вы помещают в термостат при 37°C, желатину - при комнатной температуре.

Материал и оборудование*

18-часовая агаровая культура <i>V. cholerae cholerae</i> на скошенном МПА	1 пробирка
18-часовая агаровая культура <i>V. cholerae eltor</i> на скошенном МПА	1 пробирка
18-часовая агаровая культура <i>V. cholerae O139</i> на скошенном МПА	1 пробирка
Суспензия клеток <i>V. cholerae eltor</i> и <i>E. coli</i> в физиологическом растворе	1 пробирка
МПБ, pH 7,6-7,8	3 пробирки
МПА, pH 7,8-8,0 скошенный	3 пробирки
МПА, pH 7,8-8,0	4 чашки
Среда TCBS	4 чашки

1% ПВ	3 пробирки
0,3% ПЖА	3 пробирки
Среда крахмальная с индикатором Андреде	3 пробирки
Среда лактозо-сахарозная	3 пробирки
Желатина	3 пробирки
Среда Гисса с сахарозой	3 пробирки
Среда Гисса с маннозой	3 пробирки
Среда Гисса с арабинозой	3 пробирки
Дистиллированная вода	2 мл
Пипетка пастеровская	4 шт.
Чашка Петри	1 шт.
Термостат на 37°C	
Предметное стекло	.
Покровное стекло	.

Примечание * – здесь и далее рассчитано на одного курсанта.

Занятие 2

2.1. Изучение культурально-морфологических и биохимических свойств *V. cholerae cholerae*, *V. cholerae eltor* и *V. cholerae O139* (продолжение)

Изучение характера роста культур на МПБ и 1% ПВ.
Изучение морфологии колоний на МПА и селективных средах.

Сравнение характера роста холерных вибрионов и кишечной палочки на МПА и селективных средах.

Изучение подвижности вибрионов в 0,3% ПЖА.

Определение у культур ферментативной группы Хейберга-Смита по результатам разложения сахарозы, маннозы, арабинозы (приложение 4.6.1.).

Определение характера изменения лактозо-сахарозной среды.

Определение у культур диастатической активности по результатам ферментации крахмала (приложение 4.6.1.)

Проведение предварительного учета протеолитической активности (приложение 4.6.1.)

2.2. Определение принадлежности культуры к роду *Vibrio*

Приготовление препарата с культурой на предметном стекле. Окраска препарата по Граму.

Определение подвижности культуры в раздавленной капле.

Определение у культуры наличия индофенолоксидазы (приложение 4.6.1.)

Посев культуры на среду Хью-Лейфсона (приложение 4.6.1.)

Посев культуры на среды с лизином, орнитином, аргинином и контрольную среду (приложение 4.6.1.)

Перенос посевов в термостат при 37° на 18 – 20 часов.

Материал и оборудование

МПА, рН 7,8-8,0 скошенный	3 пробирки
Среда Хью-Лейфсона	2 пробирки
Среда Биргер-Крушинской с аргинином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской с лизином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской с орнитином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской без аминокислоты (контроль)	1 пробирка
Предметное стекло	
Покровное стекло	
Масло вазелиновое стерильное	5-7 мл
Микроскоп с фазово-контрастным устройством	
Реактивы для окраски по Граму	
Реактив на оксидазу	0,5 мл
Термостат	

Занятие 3

3.1. Определение принадлежности культуры к роду *Vibrio* (продолжение)

Определение принадлежности культуры к роду *Vibrio* по пяти тестам.

3.2. Определение принадлежности культуры к виду *V. cholerae*

Изучение культуры в реакции слайд-агглютинации с холерными О-, Инаба-, Огава-, RO-, O139 сыворотками (приложение 4.6.2.).

Постановка развернутой реакции агглютинации *V.cholerae* с соответствующими холерными сыворотками (приложение 4.6.2.).

Постановка реакции иммобилизации вибрионов (РИВ) (приложение 4.6.2.).

Посев культуры на среду Кларка (приложение 4.6.3.).

Постановка пробы с холерными фагами (приложение 4.6.3.).

Постановка пробы с полимиксином В (приложение 4.6.3.).

Примечание:

– с *V.cholerae* O139 ставится только слайд-агглютинация.

– посеять агаровую культуру *V. cholerae eltor* в 4-5 мл МПБ (для постановки пробы Грейга) и на скошенный МПА.

Материал и оборудование

МПБ pH 7,6-7,8 5-8 мл	3 пробирки
0,7% ПЖА pH 7,6-7,8	2 пробирки
МПА pH 7,8-8,0	2 чашки
МПА, pH 7,8-8,0 скошенный	1 пробирка
Среда Кларка по 1 мл	2 пробирки
МПА pH 7,0-7,2 с полимиксином 50 ед/мл	2 чашки

Холерные диагностические бактериофаги классический и эльтор (цельный, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} до ДРТ)	по 0,5 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная О1 1:50	4 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная О1 1:100	0,5 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная РО 1:50	4 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная Инаба 1:50	4 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная Огава 1:50	4 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная О139 1 : 10	4 мл
2,5% эритроциты морской свинки	0,5 мл
Физиологический раствор	50 мл
Дистиллированная вода	20 мл
Пробирка бактериологическая	60 шт.
Пипетка на 5 мл	2 шт.
Пипетка на 2 мл	4 шт.
Пипетка на 1 мл	4 шт.
Пипетка пастеровская	4 шт.
Чашка Петри	1 шт.
Водяная баня	
Термостат	
Микроскоп с фазово-контрастным устройством	

Занятие 4

4.1. Определение принадлежности культуры к виду *V.cholerae*

Учет РА. Определение серогруппы и сероварианта холерного вибриона.

4.2. Дифференция биоваров *V. cholerae cholerae* и *V.cholerae eltor* (приложение 4.6.3.)

Учет пробы с диагностическими холерными фагами классическим и эльтор.

Учет пробы с полимиксином В.

Учет реакции Фогес-Проскауэра.
Постановка и учет реакции гемагглютинации.

4.3. Изучение эпидемической значимости *V. cholerae* *eltor* комплексным методом

Приготовление 3-часовой бульонной культуры.
Постановка пробы с фагами СТХ⁺ и СТХ⁻ (приложение 4.6.5.).

Постановка пробы Грейга (приложение 4.6.5.).

Материалы и оборудование

МПА рН 7,8-8,0	1 чашка
МПБ рН 7,6-7,8 5-8 мл	1 пробирка
0,7 % ПЖА рН 7,6-7,8	1 пробирка
Агар Мартена рН 7,6-7,8	1 чашка
Фаги СТХ ⁺ и СТХ ⁻	по 0,5 мл
6% альфа-нафтол	3 мл
40% КОН	1 мл
1% эритроциты барана по 1 мл	2 пробирки
Пипетка пастеровская	2 шт.
Пипетка на 1 мл	5 шт.
Пробирка бактериологическая	2 шт.
Водяная баня	
Термостат	
Холодильник	

Занятие 5

5.1. Изучение эпидемической значимости *V. cholerae* *eltor* комплексным методом (продолжение)

Учет результатов пробы Грейга.

Учет результатов пробы с фагами СТХ⁺, СТХ⁻ и определение эпидемической значимости культуры по таблице (табл. 3).

Посев культуры на МПБ для определения чувстви-

тельности к антибиотикам.

5.2. Определение эпидемической значимости *V.cholerae* в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретическим учетом результатов.

Постановка ПЦР для выявления в исследуемом материале фрагмента гена *ctxA V. cholerae* (приложение 4.6.5).

Материалы и оборудование:

ДНК штамма холерного вибриона	10 мкл
Тест-система для выявления ДНК <i>V. cholerae</i> (<i>ctxA+</i>) методом полимеразной цепной реакции («ГенХол»)	на 3 реакции
Дистиллированная вода	10 мкл
Агароза	1,5 г
1 х трис-боратный электрофорезный буфер	1,5 л
Раствор бромистого этидия	25 мкл
Буфер для нанесения ПЦР-продуктов в гель	7,5 мкл
Пробирка 0,2 мл	4 шт.
Одноразовые наконечники 0,5-10 мкл	7 шт.
Одноразовые наконечники до 200 мкл	3 шт.
Пластиковые микропробирки типа «Eppendorf» объемом 200 мкл	3 шт.
Дозатор автоматический одноканальный с переменным объемом 50-200 мкл	1 шт.
Дозатор автоматический одноканальный с переменным объемом 0,5-10 мкл	1 шт.
Штатив «рабочее место» для пробирок 200 мкл	1 шт.
Амплификатор ДНК с нагреваемой крышкой	
Весы лабораторные электронные	
Источник питания для электрофореза в агарозном геле	
Камера для горизонтального электрофореза	
УФ – трансиллюминатор	

Занятие 6

6.1. Определение эпидемической значимости и идентификация *V. cholerae* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Проведение идентификации и оценка эпидемической значимости по комплексу генов *ctxA*, *tcpA*, *wbeT*, *hlyA*, *wbfR* в ПЦР с учетом результатов в режиме «реального времени» (приложение 4.6.5.).

Материалы и оборудование:

ДНК штамма холерного вибриона	20 мкл
Набор реагентов для выявления ДНК <i>V. cholerae</i> и идентификации патогенных штаммов <i>V. cholerae</i> в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс <i>Vibrio cholerae</i> -FL»), в т. ч. - пробирка ПЦР-смесь-1-FRT <i>V. cholerae</i> «Скрин» - пробирка ПЦР-смесь-1-FRT <i>V. cholerae</i> «Тип»	4 шт. 3 шт.
Одноразовые наконечники 0,5-10 мкл	8 шт.
Дозатор автоматический одноканальный с переменным объемом 0,5-10 мкл	1 шт.
Штатив «рабочее место» для пробирок 200 мкл	1 шт.
Амплификатор «Rotor-Gene» 3000 или «Rotor-Gene» 6000	

6.2. Изучение чувствительности *V. cholerae eltor* к антибиотикам (приложение 4.6.5.)

Определение чувствительности холерного вибриона к антибиотикам методом диффузии в агаре с использованием 18-20-часовой агаровой культуры.

Определение чувствительности холерного вибриона к ампициллину методом серийных разведений в жидкой питательной среде с использованием 18-часовой агаровой культуры.

Материалы и оборудование

Агар Мюллер-Хинтона или среда АГВ по 25 мл в чашках диаметром 100 мл	1 чашка
Бульон Мартена или Хоттингера рН 7,2-7,4	50 мл
Раствор тетрациклина в бульоне 256 мкг/мл	5 мл
Диск с антибиотиком	по 1 диску каждого антибиотика
Пробирка бактериологическая стерильная	20 шт.
Пипетка на 5 мл	2 шт.
Пипетка на 1 мл	14 шт.
Термостат	

Занятие 7

7.1. Изучение чувствительности *V. cholerae eltor* к антибиотикам (продолжение)

Учет результатов изучения чувствительности культур к антибиотикам по зонам задержки роста вокруг дисков.

Учет результатов изучения чувствительности культур к ампициллину методом серийных разведений в жидкой среде. Определение МПК антибиотика в отношении изучаемых культур.

Оценка результатов по таблице 4.

7.2. Дифференциация некоторых представителей семейств *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* и *Enterobacteriaceae*, сходных по фенотипическим признакам

Изучение морфологии колоний на МПА *V. cholerae* неO1/неO139, *Aeromonas*, *Plesiomonas*.

Изучение морфологии микробных клеток в мазках,

окрашенных по Граму.

Приготовление препарата «раздавленная капля» из агаровой культуры.

Определение оксидазной активности.

Посев культуры на среды:

Хью-Лейфсона

Гисса с маннитом, инозитом, сахарозой, маннозой, арабинозой

Биргер-Крушинской с лизином, орнитином и аргинином

Материалы и оборудование

18-часовая культура <i>V. cholerae</i> неO1/неO139 на пластинке МПА	1 чашка
18-часовая культура <i>Aeromonas</i> на пластинке МПА	1 чашка
18-часовая культура <i>Plesiomonas</i> на пластинке МПА	1 чашка
Среда Хью-Лейфсона	6 пробирок
Среда Гисса с маннитом	3 пробирки
Среда Гисса с инозитом	3 пробирки
Среда Гисса с арабинозой	3 пробирки
Среда Гисса с сахарозой	3 пробирки
Среда Гисса с маннозой	3 пробирки
Среда Биргер-Крушинской с аргинином	3 пробирки
Среда Биргер-Крушинской с лизином	3 пробирки
Среда Биргер-Крушинской с орнитином	3 пробирки
Среда Биргер-Крушинской без аминокислоты (контроль)	3 пробирки
Реактив на оксидазу	0,5 мл
Масло вазелиновое стерильное	7-8 мл
Пипетка на 5 мл	3 шт
Термостат	
Линейка или кронциркуль	

Занятие 8

8.1. Дифференциация некоторых представителей семейств *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* и *Enterobacteriaceae*, сходных по фенотипическим признакам (продолжение)

Определение типа утилизации глюкозы по результатам изменения среды Хью-Лейфсона.

Учет изменения сред Гисса с маннитом, инозитом, сахарозой, маннозой и арабинозой.

Оценка декарбоксилазной и дигидролазной активности в средах Биргер-Крушинской

Сравнение полученных результатов с таблицей 1.

2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

В системе противохолерных мероприятий существенное значение имеют лабораторные методы исследования, среди которых основным является бактериологический метод, направленный на обнаружение возбудителей холеры – *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. Бактериологический анализ проводится с диагностической целью и по эпидемиологическим показаниям.

Объектами исследования могут быть испражнения, рвотные массы, желчь, трупный материал (отрезки тонкого кишечника, желчный пузырь), различные предметы, загрязненные выделениями больного, вода, пищевые продукты, обитатели водоемов и другие объекты окружающей среды.

Забор, доставка и порядок исследования материала проводятся в соответствии с действующими методическими указаниями МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» (2007 г.) и МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального,

регионального и федерального уровней» (2011 г.).

Алгоритм лабораторной диагностики *V. cholerae* (рис. 5) основан на поэтапном использовании жидкой накопительной среды (1% ПВ, 1% ПВ с теллуридом калия) с последующим высевом из нее на плотные щелочные агары (мясо-пептонный, Мартена, Хоттингера) и селективные дифференциально-диагностические среды (TCBS, СЭДХ, Монсура, Седук и др.). Все среды, консерванты, используемые для транспортировки материала в лабораторию, ингибиторы посторонней микрофлоры применяются только проверенными на ростовые качества. На щелочном агаре колонии холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в типичной S-форме - круглые, гладкие, плоские, голубоватые, гомогенные с ровными краями, прозрачные в проходящем свете, светло-голубые под стереоскопическим микроскопом в косопадающем свете с голубым или зеленоватым оттенком.

Колонии холерных вибрионов на селективных средах TCBS и СЭДХ имеют ярко-желтую окраску на зеленом или синем фоне среды, полупрозрачные; на среде Монсура – матовые, серовато-белого цвета с черным центром (окраска центра наиболее выражена через 24-48 ч).

Посевы материала на всех этапах выращиваются при 37°C в 1% ПВ в течение 6-8 ч, 1% ПВ с теллуридом калия – 12-18 ч, на щелочном агаре – 14-16 ч, плотных селективных средах – 18-24 ч.

Бактериологическое исследование на холеру материала от больных, лиц, обследуемых на вибрионосительство, проб воды и других объектов отличается только на первом этапе.

На I этапе бактериологического анализа испражнений и рвотных масс больного, содержимого кишечника и желчного пузыря трупа лиц, умерших от холеры, ис-

следуемый материал в количестве 0,5-1 мл засеивается пипеткой в 50-100 мл 1% ПВ (I-ая среда накопления) и петлей на пластинку щелочного агара и одну из селективных сред. Поскольку в данном материале предполагается наличие большого количества возбудителя, целесообразно на этом этапе применить ускоренные методы исследования (МФА, РИВ и ПЦР со специфическими праймерами).

При исследовании материала от больных, подозрительных на заболевание холерой, не допускается использование 1% пептонной воды с теллуридом калия.

Материал от подозрительных на вибрионосительство засеивается в 50 мл среды накопления при индивидуальных анализах и в 100 мл - при групповых, объединяя в один флакон по 0,5-1 мл пробы не более чем от 5 человек. К групповым посевам прибегают в случаях проведения массовых обследований на вибрионосительство.

Материал, доставленный в 5 мл 1% пептонной воды, полностью используется для посева в 50 мл среды накопления. В случае поступления в лабораторию материала, забранного в 50 мл 1% пептонной воды во флаконе и доставки его не позже 2 ч после забора пробы, флакон помещаются в термостат на 6 ч для накопления возбудителя. При доставке материала в более поздние сроки 5 мл его засеивается в 50 мл 1% пептонной воды и ставится в термостат для культивирования (на 6 ч.)

В отдельных случаях при бактериологическом исследовании материала от лиц, принимавших антибиотики, он засеивается в 200-300 мл 1% пептонной воды (предпочтительно в широкодонные колбы) и на 2 чашки щелочного агара так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Посевы инкубируются при 37°C в течение 24 ч, а спустя 8-10 ч пребывания

в термостате делаются высевы с поверхностного слоя среды на пластинки щелочного агара. Использование второй среды обогащения в этом варианте исследования не целесообразно.

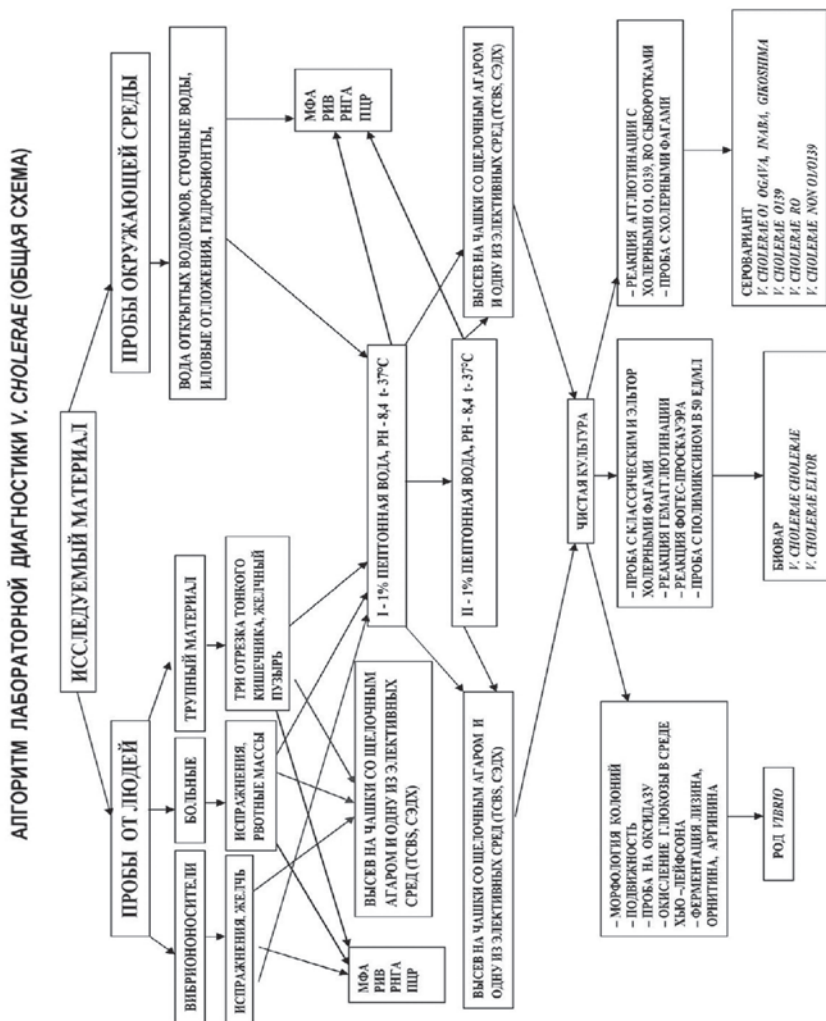


Рис. 5 Алгоритм лабораторной диагностики *V. cholerae*

На II этапе (через 6 – 8 ч от начала исследования) с поверхности I-ой среды накопления производится пересев на пластинку щелочного агара, на одну из селективных сред, и в 5-8 мл 1% ПВ (II-ая среда накопления). При отрицательных результатах ускоренных методов исследования нативного материала их повторяют, исследуя I-ую среду накопления.

На III этапе (через 12-16 ч от начала исследования) проводится высев с поверхности II-ой среды накопления на пластину щелочного агара и изучается характер роста на чашках, засеянных нативным материалом, с целью отбора подозрительных на вибрион колоний и выделения чистой культуры. При отборе колоний обращают внимание на типичные и на атипичные колонии.

Размеры колоний на щелочном агаре через 10-12 ч инкубации не превышают 1 мм, а к 18-24 ч достигают 2-3 мм в диаметре. Темпы формирования колоний холерных вибрионов на селективных средах несколько замедлены, поэтому посевы просматриваются через 18-24 ч.

Отобранные агглютинирующиеся и неагглютинирующиеся холерными сыворотками O1 или O139 колонии отсеивают для дальнейшей идентификации на одну из полиуглеводных сред (лактозо-сахарозную, Клиглера, Ресселя и др.) и пробирку МПБ для накопления микробной массы и определения чувствительности к антибиотикам.

При положительной реакции агглютинации с холерной O1 сывороткой в разведении 1:50 в слайд – агглютинации в этом же разведении ставится реакция иммобилизации, готовятся мазки для окраски по Граму и обработки флуоресцирующими иммуноглобулинами. При положительных результатах в этих тестах выдается предварительный ответ об обнаружении в исследу-

дуемом материале холерного вибриона O1, а в случае положительной реакции с сывороткой O139 - холерного вибриона O139 серогруппы.

На IV этапе (через 18-24 ч от начала исследования) если ранее не обнаружены подозрительные колонии производится их отбор (см. III этап) и посев на плотные среды. С положительными на *V. cholerae* культурами ставится развернутая реакция агглютинации со всеми холерными сыворотками и холерными фагами.

V этап (через 24-36 ч от начала исследования). Просматриваются полиуглеводные среды и отбираются культуры с типичным для вибрионов характером роста и изменений среды. На двууглеводных средах наблюдается характерное изменение цвета столбика при сохранении цвета скошенной части без образования газа. На основании положительных результатов агглютинации с холерными сыворотками O1, Инаба и/или Огава выдается предварительный положительный ответ о выделении из исследуемого материала культуры холерного вибриона O1 соответствующего серовара. Если выделенная культура реагирует с холерной сывороткой O139 при отрицательном результате с сыворотками O1 серогруппы, выдается ответ о выделении холерного вибриона O139 серогруппы.

VI этап (через 36-48 ч от начала исследования). Учёт результатов идентификации и выдача окончательного ответа о выделении культуры холерного вибриона соответствующей серогруппы и биовара. Для холерного вибриона O1 (Инаба, Огава или Гикошима) указывают эпидемическую значимость ориентировочно по тестам гемолитической активности, чувствительности к фагам СТХ⁺ и СТХ⁻ и окончательно - по результатам ПЦР на присутствие в геноме выделенной культуры генов *ctxA* и *tcpA*. Эпидемическая значимость холер-

ного вибриона O139 серогруппы определяется по тем же тестам (за исключением чувствительности к фагам СТХ⁺ и СТХ⁻). К окончанию этого этапа исследования должна быть определена антибиотикограмма выделенной культуры (приложение 4.6.6.). При выделении от больного или вибриононосителя культуры холерного вибриона, не агглютинирующейся холерными сыворотками (O1 и O139), выдается ответ об обнаружении холерного вибриона не O1/не O139 серогруппы. При наличии агглютинирующих диагностических сывороток определяют принадлежность указанных вибрионов к другим серогруппам (O2-O83).

При исследовании воды (питьевой, поверхностных водоемов и др.) необходимо учитывать время доставки проб и выбирать наиболее подходящий вариант исследования.

Если вода поступила в лабораторию утром, к исследуемой пробе добавляется основной раствор пептона до 1% концентрации, определяется рН и при необходимости подщелачивается 10% раствором едкого натрия до рН $8,4 \pm 0,1$. Анализ пробы (1000 мл) проводится в двух объемах по 500 мл, время инкубации 8-10 ч. В конце рабочего дня производится высеивание на II-ую среду накопления - 1% ПВ или 1% ПВ с теллуридом калия (в концентрации 1:100000 или 1:200000) в объеме 10 мл. Время инкубации в среде без теллурида калия 6 ч, с теллуридом калия - 18-20 ч. Ход анализа, начиная со II этапа, аналогичен исследованию материала от больного.

При поступлении анализа воды в лабораторию во второй половине дня в исследуемую воду (в двух объемах по 500 мл) вносится основной раствор пептона до 1% концентрации и теллурид калия. При необходимости в воду добавляется 10% раствор едкого натрия (до рН $8,4 \pm 0,1$). Через 18-24 ч культивирования при 37°C

производится пересев в 10 мл 1% ПВ (II-ая среда обогащения). Время выращивания - 6 ч.

Возможен и другой вариант исследования - после установления щелочной реакции и добавления основного раствора пептона (I-ая среда обогащения) пробы сохраняются при комнатной температуре (не выше 25°C) до утра. Утром 5 мл с поверхностного слоя засеваются в 100 мл 1% ПВ (II-ая среда обогащения) и в последующем производится высеивание на щелочной агар.

При исследовании воды можно применять метод концентрирования пробы путем фильтрования ее через мембранные фильтры № 2 или № 3, смывы с которых засеваются в накопительную среду и на пластинки агара. Осадок на фильтре исследуется в МФА, РНГА и в ПЦР.

Сточные воды перед исследованием подвергают фильтрации через бумажный или марлевый фильтр.

Исследование пищевых продуктов принципиально не отличается от исследования другого материала и проводится по обычной классической схеме. Твердые пищевые продукты измельчаются, растираются в ступке с физиологическим раствором и засеваются в количестве 10 г в 100 мл накопительной среды и петлей на агаровые среды.

Масло перед посевом подвергают размягчению на водяной бане или в термостате.

Молоко и молочные продукты в количестве 5 мл (г) засеваются в 50-100 мл 1% ПВ и петлей на агаровые среды или к 500 мл молока добавляется основной раствор пептона до 1%-ной концентрации.

У гидробионтов (рыба) исследуется кишечник и жабры (у амфибий только кишечник).

Занятие 9

9.1. Исследование испражнений больного

I этап (начало исследования)

Приготовление мазков для бактериоскопии и изучение подвижности в препарате «раздавленная капля» из нативного материала.

Посев пипеткой 0,5-1,0 мл испражнений в 50-100 мл 1% ПВ (I-ая среда накопления).

Посев бактериологической петлей нативного материала на чашку МПА и чашку селективной среды.

Использование ускоренных методов исследования нативного материала:

МФА (приложение 4.6.2.)

РИВ (приложение 4.6.2.)

РНГА с использованием холерного иммуноглобулинового диагностикума (приложение 4.6.2.).

По результатам исследования ускоренными методами выдача предварительного ответа.

II этап (через 6 ч от начала исследования)

Посев пипеткой или бактериологической петлей (диаметр 5 мм) с поверхности I-ой среды накопления в 5-8 мл 1% ПВ (II-ая среда накопления).

Высев стандартной петлей с поверхности I-ой среды накопления на пластинки МПА и селективной среды.

При отрицательном результате ускоренных методов исследования нативного материала повторная постановка их с I-ой средой накопления. Выдача предварительного ответа.

III этап (через 12 ч от начала исследования)

Высев со II-ой среды накопления на пластинку МПА. Просмотр в проходящем свете невооруженным гла-

зом или под стереоскопическим микроскопом с косым освещением посевов нативного материала и отбор подозрительных на рост вибриона колоний.

При наличии подозрительных колоний (типичных и атипичных) постановка реакции слайд-агглютинации с холерной O1 сывороткой в разведении 1:50 При положительной реакции с видо- и вариантоспецифической холерными сыворотками выдача предварительного положительного ответа.

При отрицательной реакции с сывороткой O1 проверка подозрительных колоний в реакции слайд-агглютинации с сывороткой O139 (приложение 4.6.2).

Постановка реакции иммобилизации вибрионов (РИВ) (приложение 4.6.2).

Посев подозрительных на рост вибриона колоний, агглютинирующихся и неагглютинирующихся холерными сыворотками O1 или O139 на одну из полиуглеводных сред (например, лактозо-сахарозную), косяк МПА и пробирку МПБ.

Проведение с колониями, агглютинирующимися на стекле холерными сыворотками, ускоренной идентификации (занятие 13). При наличии четких положительных результатов идентификации выдача предварительного ответа о выделении возбудителя холеры.

Материал и оборудование

Каждому курсанту выдают для исследования испражнения, искусственно зараженные <i>V. cholerae cholerae</i> или <i>V. cholerae eltor</i>	1 пробирка
МПБ pH 7,6-7,8	3 пробирки
1% ПВ pH 8,2-8,4 50 мл	1 флакон
1% ПВ pH 8,2-8,4 5-8 мл	1 пробирка
МПА pH 7,8-8,0	3 чашки
МПА pH 7,8-8,0 скошенный	3 пробирки

Лактозо-сахарозная среда	3 пробирки
Холерные агглютинирующие сыворотки: O1 1:50 и 1:100 O139 в рабочем разведении	0,5 мл 0,5 мл
Люминесцирующая холерная сыворотка (в рабочем разведении)	0,5 мл
Чашки Петри для слайд - агглютинации	1 шт.
Эритроцитарный холерный антигельный диагностикум	0,5 мл
Пробирка бактериологическая стерильная	2 шт.
Пипетка на 1 мл	3 шт.
Автоматический дозатор	1
Термостат	
Микроскоп с фазово-контрастным устройством	1
Микроскоп стереоскопический с косым освещением	1

Занятие 10

10.1. Исследование испражнений больного - IV этап (через 24 ч от начала исследования)

Отбор культуры на полиуглеводных средах с типичным для вибрионов характером роста.

Проверка культуры на принадлежность к роду *Vibrio* (окраска по Граму, подвижность, наличие оксидазной активности, характер роста на средах Хью – Лейфсона и с аминокислотами лизином, орнитином, аргинином.

Подтверждение принадлежности культуры к виду *Vibrio cholerae*, биоварам *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor* по полной схеме:

- постановка развернутой реакции агглютинации с холерными сыворотками O1, RO, Инаба, Огава;
- постановка пробы с холерными фагами классическим и эльтор (приложение 4.6.3.);
- определение ферментации сахарозы, маннозы, арабинозы (приложение 4.6.1.);

- определение чувствительности к полимиксину В (приложение 4.6.3.);
- постановка реакции гемагглютинации (приложение 4.6.3.);
- отсев культуры на косячок МПА и 0,3% ПЖА (для хранения);
- отсев культуры на среду Кларка для постановки реакции Фогес-Проскауэра (приложение 4.6.3.)

Определение эпидзначимости культуры комплексным методом (приложение 4.6.5.):

- постановка пробы с фагами СТХ⁺ и СТХ⁻;
- отсев культуры для постановки пробы Грейга в МПБ.

Изучение чувствительности культуры к антибиотикам методом серийных разведений в жидкой питательной среде (приложение 4.6.6.).

Изучение культур, не агглютинирующихся на стекле холерными сыворотками, но оксидазоположительных:

- утилизацию глюкозы в среде Хью-Лейфсона (приложение 4.6.1.) ;
- декарбоксилирование аминокислот в среде Биргер – Крушинской(приложение 4.6.1.) ;
- постановка реакцию РИВ (приложение 4.6.2.);

При наличии в лаборатории сывороток О2 – О83 серогрупп и фагов ТЭПВ определение сероварианта и фаговара выделенной культуры в соответствующих пробах и реакциях.

10.2. Исследование воды

I этап (начало исследования)

Анализ пробы воды проводится в двух объемах по 450 мл. К 450 мл исследуемой воды добавление 50 мл

основного раствора пептона (до 1% концентрации) и 11,1 мл или 5,6 мл 0,05% рабочего разведения теллури-та калия (до концентрации 1:100000 и 1:200000 соот-ветственно).

Определение рН. При необходимости подщелачи-вание 10% раствором едкого натрия до рН 8,4±0,1. Инкубация при 37°C в течение 14-18 ч.

Материал и оборудование

Каждому курсанту выдают для исследования 900 мл воды, искусственно инфицированных <i>V. cholerae</i> не O1	2 флакона по 450 мл
Среда Хью-Лейфсона	2 пробирки
Среда Биргер-Крушинской с аргинином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской с лизином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской с орнитином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской без аминокислоты (контроль)	1 пробирка
Среда Гисса с маннитом	1 пробирка
Среда Гисса с инозитом	1 пробирка
Среда Гисса с сахарозой	2 пробирки
Среда Гисса с маннозой	2 пробирки
Среда Гисса с арабинозой	2 пробирки
МПА рН 7,0-7,2 с полимиксином 50 ед/мл	1 чашка
МПА рН 7,6-7,8	3 чашки
МПА рН 7,6-7,8 скошенный	1 пробирка
0,7% ПЖА рН 7,6-7,8	3 пробирки
0,3% ПЖА рН 7,6-7,8	1 пробирка
МПБ рН 7,6-7,8	2 пробирки
Бульон Мартена или Хоттингера рН 7,6-7,8	25 мл
Среда Кларка	2 пробирки
Раствор тетрациклина в бульоне 256 мкг/мл	2,5 мл
Пептон основной (10%) рН 8,2-8,4 по 50 мл	2 флакона
0,05% раствор теллуриата калия	25 мл
Фаги СТХ ⁺ и СТХ ⁻ (цельные)	по 0,3 мл
Фаги холерные диагностические классический и эльтор (в разведениях до ДРТ)	по 0,3 мл
1% эритроциты барана по 1 мл	2 пробирки
2,5% эритроциты морской свинки	0,5 мл
Масло вазелиновое стерильное	5 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная O1 1:50	2 мл

Сыворотка агглютинирующая холерная О1 1:100	0,5 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная РО 1:50	2 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная Инаба 1:50	2 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная Огава 1:50	2 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная О139 в рабочем разведении	0,5 мл
10% раствор едкого натрия	10 мл
Реактив на оксидазу	0,2 мл
Физиологический раствор	30 мл
Пробирка бактериологическая для РА	30 шт.
Пробирка бактериологическая стерильная	12 шт
Пипетка на 5 мл	3 шт.
Пипетка на 2 мл	3 шт.
Пипетка на 1 мл	20 шт.
Индикаторные бумажки (для определения pH)	1 шт.
Термостат	

Занятие 11

11.1. Исследование испражнений больного (окончание)

V, VI, VII этапы

Постановка пробы Грейга.

Постановка реакции Фогес-Проскауэра.

Учет результатов окончательной идентификации выделенной культуры.

При подтверждении принадлежности культуры к роду *Vibrio*, виду *cholerae* выдача окончательного ответа: «холерный вибрион выделен».

При отрицательных тестах, детектирующих вид холерного вибриона, принадлежащего к О1, О139 серогруппам, выдача ответа: «холерный вибрион не выделен».

При выделении культуры, не агглютинирующейся холерными О1 и О139 сыворотками, но относящейся к роду *Vibrio*, принадлежащей к О2 – О83 сероварам, лизирующейся фагами ТЭПВ, выдайте ответ: «выделен вибрион не О1 не О139 серогруппы».

11.2. Исследование воды

II этап (через 18 ч от начала исследования)

Пересев с поверхности I-ой среды накопления в 10 мл 1% ПВ (II-ая среда накопления); инкубирование при 37°C в течение 6 ч.

Высев с поверхности I-ой среды накопления на пластинку МПА.

III этап (через 24 ч от начала исследования)

Высев с поверхности II-ой среды накопления на пластинку МПА.

Материалы и оборудование

МПА рН 7,6-7,8	4 чашки
1% ПВ рН 8,0-8,4 по 5-8 мл	2 пробирки
6% альфа-нафтол	3 мл
40% КОН	1 мл
Термостат	

Занятие 12

12.1 Исследование воды

IV и V этап

Исследование посевов с I-ой и II-ой сред накопления:

Просмотр посевов, отбор подозрительных на рост вибриона типичных и атипичных колоний, проверка их в слайд-агглютинация с холерными сыворотками O1, Инаба, Огава и O139.

Отсев 2-3 колоний, агглютинирующихся и неагглютинирующихся холерными сыворотками, на полиуглеводную среду (например, лактозо-сахарозную), косячок МПА и МПБ. Инкубирование посевов при 37°C.

12.2. Методы ускоренной диагностики холеры.

Исследование испражнений больного с типичной клиникой

Применение флуоресцентно-серологических методов:

- Приготовление из нативного материала мазка, обработка его люминесцирующей холерной сывороткой и просмотр. Через 1,5-2 ч выдача предварительного ответа (приложение 4.6.2.).

- Посев нативного материала по 0,1 мл в 5-8 мл 1% ПВ и на 4 чашки МПА. Через 3, 4, 5, 6 ч инкубирования при 37°C приготовление мазков с 1% ПВ и чашек (путем смыва физиологическим раствором) с обработкой люминесцирующей холерной сывороткой и их просмотр. Через 3-6 ч при нарастании количества специфически «окрашенных» вибрионов, определяемых в мазках, выдача ответа о наличии возбудителя холеры в исследуемом материале.

- Исследование нативного материала в РИВ под влиянием холерных сывороток О1 (разведение 1:100), Инаба и Огава (разведении 1:50). Через 15-20 мин выдать предварительный ответ (приложение 4.6.2.).

Исследование нативного материала в РА в 1% ПВ и в пробе с диагностическими холерными классическим и эльтор бактериофагами (приложение 4.6.2.):

- в разведенные в 1% ПВ в объеме 1 мл холерные сыворотки О1, Инаба, Огава (с 1:100 до титра) и контроль антигена (1 мл 1% ПВ) добавляются 2-3 капли исследуемого материала. Контроль сыворотки: 1 мл в разведении 1:100 (без исследуемого материала). Учет реакции агглютинации через 1 ч. При положительном результате виден агглютинативный рост с просветлением среды при отсутствии агглютинации в контрольной пробирке. При отрицательном результате - гомогенное помутнение среды (наблюдение в течение 3 часов).

- Постановка пробы с холерными фагами классическим и эльтор двуслойным методом. Учет фаголизиса через 1,5-2 ч инкубирования. При положительных ре-

зультатах РА, фаголизиса и данных микроскопии вы-
дается окончательный ответ.

Постановка микрометодом РНГА и РТНГА с холер-
ным иммуноглобулиновым эритроцитарным диагно-
стикумом (приложение 4.6.2.). Исследуемый материал
предварительно прогревается в течение 20 мин при
100°C. Через 2 ч выдача предварительного ответа.

Применение мультиплексного ПЦР-анализа натив-
ного материала от больного холерой (занятие 5).

Посев исследуемых испражнений в 5-8 мл 1% ПВ и на
пластинку МПА для выделения культуры и ее изучения.

Материал и оборудование

Каждому курсанту выдаются испражнения больного, искусственно инфицированные холерным вибрионом О1 серогруппы	1 пробирка
1% ПВ рН 8,0-8,4	20 мл
1% ПВ рН 8,0-8,4 - 5-8 мл	2 пробирки
МПА рН 7,8-8,0	5 чашек
Агар Мартена рН 7,6-7,8	1 чашка
0,7% ПЖА рН 7,8-8,0	1 пробирка
МПБ рН 7,6-7,8	3 пробирки
Лактозо-сахарозная среда	3 пробирки
МПА рН 8,0-8,2 скошенный	3 пробирки
Диагностикум эритроцитарный холерный антительный	0,5 мл
Люминесцирующая холерная сыворотка в рабочем разведении	0,3 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная О1 1:50	0,5 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная О1 1:100	0,5 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная Огава 1:50	0,5 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная Инаба 1:50	0,5 мл

Холерные диагностические бактериофаги классический и эльтор (в разведениях до ДРТ)	по 0,5 мл
Пробирка бактериологическая	18 шт.
Пипетка на 5 мл	1 шт.
Пипетка на 1 мл	7 шт.
Автоматический дозатор	
Термостат	

Занятие 13

Исследование воды

13.1. Ускоренная идентификация культуры по основным признакам

Просмотр чашек с посевом испражнений больного на МПА (предыдущее занятие), отбор подозрительных на рост вибрионов колоний.

Микроскопия мазков, постановка слайд-агглютинации и РИВ с подозрительными колониями, используя агглютинирующие холерные O1 и O139 сыворотки.

При положительной слайд-агглютинации отсеиваются колонии в 3 мл МПБ и после 3 ч инкубации в термостате подлежат изучению следующие признаки:

- определение типа расщепления глюкозы;
- определение декарбоксилазной и дигидролазной активности;
- агглютинабельность в пределах титра с холерными сыворотками O1, Инаба и Огава, O139, разведенными 1% ПВ в объеме 1 мл (занятие 12);
- чувствительность к холерным фагам классическому и эльтор;
- ферментация сахарозы, маннозы, арабинозы с использованием среды в объеме 0,5-1 мл.

Во все пробирки добавляется по 1 капле изучаемой культуры. Учет результатов через 4-6 ч инкубирования посевов при 37°C. При наличии четких положительных

признаков вида *V. cholerae* выдача окончательного ответа о выделении возбудителя холеры.

Материал и оборудование

МПБ рН 7,8-8,0	3 пробирки
0,7% ПЖА рН 7,6-7,8	2 пробирки
Агар Мартена рН 7,6-7,8	2 чашки
1% ПВ рН 8,0-8,4	20 мл
Среда Гисса с сахарозой 1 мл	2 пробирки
Среда Гисса с маннозой 1 мл	2 пробирки
Среда Гисса с арабинозой 1 мл	2 пробирки
Среда Гисса с маннитом 1 мл	1 пробирка
Среда Гисса с инозитом 1 мл	1 пробирка
Среда Хью-Лейфсона	2 пробирки
Среда Биргер-Крушинской с аргинином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской с лизином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской с орнитином	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской (контроль)	1 пробирка
Фаги холерные диагностические классический и эльтор (в разведениях до ДРТ)	по 0,3 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная РО 1:50	2,0 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная Инаба 1:50	2,0 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная Огава 1:50	2,0 мл
Пробирка бактериологическая	50 шт.
Пипетка на 5 мл	5 шт.
Пипетка на 2 мл	3 шт.
Пипетка на 1 мл	12 шт.
Реактив на оксидазу	0,5 мл
Термостат	

Занятие 14

14.1. Исследование воды

Учет результатов изучения выделенной культуры.

По результатам изучения культуры выдача на анализ окончательного ответа.

3. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ

Серологические методы исследования применяются для выявления переболевших, вибрионосителей, определения напряженности иммунитета у вакцинированных, в эпидемиологической практике для ретроспективного установления эпидемиологических связей. Различные иммунологические реакции позволяют обнаружить в сыворотке крови обследуемых специфические антитела: агглютинины, вибриоцидины, антитоксины. Исследованию подвергаются парные сыворотки с интервалом 7-10 дней. Первая проба берется на 1-3 день болезни. В лаборатории сыворотки инактивируются при 56°C в течение 30 мин и при необходимости сохраняются при 4°C.

Кровь для серологических реакций берется из вены в количестве 1-5 мл. Кровь можно забрать из пальца микропипеткой в объеме 0,4 мл и внести в стерильный флакон с 1,6 мл физиологического раствора (1:5) или несколько капель крови нанести на лист простерилизованной писчей бумаги, поместить в пробирку, а в лаборатории вырезать кружочки бумаги с каплями, залить 0,9 мл стерильного 0,9% раствора хлористого натрия (разведение 1:10), экстрагировать 3-4 ч при комнатной температуре, инактивировать при 56°C в течение 30 мин и подвергнуть исследованию.

Агглютинины у больных холерой появляются на 5-7 день заболевания и максимального титра обычно до-

стигают к 14-15 дню от начала заболевания. Затем их титр постепенно снижается. Агглютинины в сыворотке крови больного холерой определяются в объемной реакции агглютинации. В качестве антигена используется живая культура в S-форме, выделенная в очаге холеры или диагностикум - клетки холерного вибриона, убитые кипячением или формалином. Положительной считается РА на 3-4 креста в разведении 1:40 и выше. Диагностическое значение имеет четырехкратный и более высокий подъем титров антител при исследовании парных сывороток.

Противохолерные антитела можно быстро выявить методом фазово-контрастной микроскопии, используя в качестве индикаторного штамма культуру холерного вибриона, выделенную в данном очаге, или музейный штамм того же биовара и серовара. Кроме того, можно поставить реакцию нейтрализации антигена (РНАг) с холерным иммуноглобулиновым эритроцитарным диагностикумом и РНГА с антигенным холерным эритроцитарным диагностикумом.

Вибриоцидные антитела (ВА) в крови больных холерой в титрах 10^{-1} - 10^{-3} обнаруживаются с 1-3 дня болезни. Вибриоцидины достигают максимального значения (10^{-4} – 10^{-8}) к 10-12 дню, а к 30 дню болезни их титр снижается. У переболевших, вибрионосителей и вакцинированных титр вибриоцидных антител колеблется от 10^{-1} до 10^{-8} . Для выявления вибриоцидных антител предложен ряд методов, основанных на том, что при наличии вибриоцидных антител в исследуемой сыворотке в присутствии комплемента происходит подавление роста холерного вибриона.

Наиболее простым является метод Финкельштейна (Finkelstain, 1962). Для постановки реакции исследуемая сыворотка инактивируется в водяной бане при

56°C в течение 30 минут. В ряд пробирок разливается по 0,9 мл. комплемента, разведенного 1:20 (можно использовать сухой комплемент или свежеполученную сыворотку морской свинки). Затем готовится серия десятикратных разведений исследуемой сыворотки в комплементе до 10^{-8} – 10^{-10} . Титрование сыворотки производится на ледяной бане.

Во все пробирки с раститрованной сывороткой добавляется по 0,1 мл. взвеси холерного вибриона, содержащей 10 тыс. м. кл. в 1,0 мл. и они помещаются на один час в термостат при 37°C, сделав предварительно высев из пробирки контроля культуры на 2 пластинки щелочного агара для определения фактической концентрации живых вибрионов в суспензии (контроль разведения). Затем их снова переносят в кювету со льдом и из каждой пробирки отдельной пипеткой высевают по 0,1 мл. культуры на пластинки щелочного агара (рН 7,6). Чашки помещаются на 18-24 часа в термостат при 37°C и после этого проводится подсчет количества выросших колоний. Необходимы следующие контроли: а) контроль комплемента (0,9 мл. комплемента и 0,1 мл. культуры холерного вибриона); б) контроль сыворотки (0,8 мл. 0,9 % раствора хлорида натрия, 0,1 мл. сыворотки и 0,1 мл. культуры); в) контроль культуры (0,9 мл. 0,9 % раствора хлорида натрия и 0,1 мл. культуры).

Вибриоцидным титром считается максимальное разведение сыворотки, которое вызывает подавление роста не менее чем 50 % клеток холерного вибриона по сравнению с контролем культуры, что выявляется подсчетом выросших колоний на агаровых пластинках из опытных и контрольных пробирок.

Пример вычисления: при посеве из опытных пробирок с разведением сыворотки 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ,

10^{-6} , 10^{-7} и т. д. на чашках соответственно выросло 0,0,5,10,15,30,38 и т. д. колоний. При высеве из пробирки контроля комплемента после инкубации при температуре ($37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) выросло 36 колоний, 50 % от этого числа составляет 18. Из пятой пробирки выросло 15 колоний, т. е. меньше 50 % от количества колоний в контроле (18), из следующей пробирки – 30, т. е. более 50 % этого же показателя. Разведение сыворотки в 5-й пробирке составляет 10^{-5} , следовательно, вибриоцидный титр в данном примере составляет 10^{-5} .

Результат реакции выражается в виде десятичного логарифма разведения сыворотки, взятого с обратным знаком (например, 10^{-5} т.е. 5). Диагностическим считается индекс 3 и выше при условии нарастания титра антител в парных сыворотках.

Существуют и другие методы (И.В.Домарадский, Е.П. Ерохин 1971, М.С. Наумшина и др. 1973) Определение вибриоцидных антител этими методами основано на ферментации углеводов. О наличии или отсутствии вибриоцидных антител судят по разложению сахарозы, регистрируемому с помощью индикатора. В практических лабораториях для определения вибриоцидных антител применяется также микрометод Бененсона и др. (1968) с использованием диагностикума холерного эритроцитарного О-иммуноглобулинового.

В сыворотках крови больных холерой, вибрионосителей и привитых холерной вакциной, содержащей субъединицу В холерного токсина можно выявлять антитела к энтеротоксину холерного вибриона. Титр антитоксинов нарастает медленно и достигает максимального значения к концу 2-ой недели заболевания. Для определения токсиннейтрализующих антител в сыворотке больных, носителей и переболевших разработан ряд методов *in vivo* и *in vitro*. Наиболее трудоем-

кими являются методы с использованием животных. В практической работе целесообразно ставить РНГА с эритроцитарным холерным энтеротоксическим диагностикумом (ЭХЭД) или с энтеротоксическим диагностикумом, изготовленным на новой основе для фиксации холерного энтеротоксина - на ганглиозидсодержащих липосомах – липосомальный холерный энтеротоксический диагностикум (ЛХЭД). Липосомальная диагностическая тест-система включает в себя помимо ЛХЭД ингредиенты для постановки реакции связывания коплемента (РСК). Диагностическим титром РНГА с ЭХЭД и РСК с ЛХЭД следует считать 1:160. Целесообразно исследовать парные сыворотки. Для определения токсиннейтрализующих антител можно использовать реакцию преципитации в геле, встречный иммуноэлектрофорез и внутрикожную пробу Крейга на кроликах светлой масти.

Занятие 15

15.1. Определение агглютининов в парных сыворотках крови больного в объемной РА

Растворить 1-ую и 2-ую инактивированные сыворотки двукратно в 1% ПВ в объеме 1 мл (с 1:10 до 1:640); приготовить пробирки с КС-контроль сыворотки в разведении 1:10 (1 мл), КА – контроль антигена 1% ПВ (1 мл).

В пробирки с раститрованными сыворотками и в КА вносится по 1 капле 3-часовой бульонной культуры холерного вибриона O1 или O139 серогруппы.

Пробирки проинкубировать при 37°C в течение 1 ч после чего провести предварительный учет результатов, затем пробирки помещаются в холодильник (при 4±0,5°C). На следующее утро проводится учет реакции.

15.2. Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови больного

Исследование сыворотки крови больного.

Готовится суспензия агаровой культуры *V. cholerae eltor*, содержащая 10^4 м.кл./мл.

В восьми пробирках 10-кратно в объеме 0,9 мл (на льду, который помещается в любую емкость), растирывается 2-ая инактивированная сыворотка в комплементе, разведенном 1:40. В девятую пробирку вносится 0,9 мл комплемента (контроль).

Во все пробирки, в том числе и контрольную, на холоду, добавляется по 0,1 мл суспензии холерного вибриона, содержащей 10^4 м. кл./мл. Смесь инкубируется при 37°C в течение 1 ч.

Штатив с пробирками через 1 ч инкубирования помещается на лед и из каждой пробирки содержимое отдельной стерильной пипеткой по 0,1 мл вносится на пластины щелочного агара.

Чашки помещаются на 18 – 24 ч в термостат (37°C) после чего проводится подсчет количества выросших колоний.

Учет результатов. За титр ВА принимается максимальное разведение сыворотки, которое вызывает 50%-е подавление роста холерного вибриона по сравнению с контролем культуры.

15.3. Определение токсиннейтрализующих антител (проба Крейга)

Занятие проводится в виде объяснения курсантам методики постановки пробы Крейга и демонстрации положительной и отрицательной реакции на кролике.

Материал и оборудование

1-ая сыворотка, инактивированная при 56°С в течение 30 минут, в разведении 1:5 (кровь взята на 3 день болезни)	2,5 мл
2-ая сыворотка, инактивированная при 56°С в течение 30 минут, в разведении 1:5 (кровь взята на 10-ий день болезни)	3,0 мл
18-часовая агаровая культура <i>V. cholerae eltor</i>	1 пробирка
МПБ рН 7,8-8,0 4-5 мл	1 пробирка
1% ПВ рН 8,0-8,4 10 мл	1 пробирка
Комплемент 1:40	
Комплемент 1:5	10 мл
Диагностикум холерный эритроцитарный О-иммуноглобулин-линовый 0,6%	
ЭХЭД -эритроцитарный холерный энтеротоксический диагностикум	0,5 мл
ЛХЭД - энтеротоксический диагностикум на ганглиозидсодержащих липосомах	0,5 мл
Физиологический раствор 20-30 мл	0,5 мл
Пробирка бактериологическая стерильная	0,5 мл
Пипетка на 5 мл	1 флакон
Пипетка на 1 мл	35 шт.
Пипетка пастеровская	1 шт.
Кювета со льдом для 10-гнездного штатива	1

Занятие 16

16.1. Определение агглютининов в парных сыворотках крови больного в объемной РА (продолжение)

Учет результатов РА.

16.2. Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови больного

Учет результатов:

- Исследования сыворотки крови больного методом Финкильштейна.
- По результатам реакции определение титра вибриоцидных антител в исследуемой сыворотке.

4. ПРИЛОЖЕНИЕ

4.1. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

4.1.1. Среды обогащения

Основной раствор пептона:

Пептон сухой	100,0 г
Хлорид натрия	50,0 г
Нитрат калия	10,0 г
Карбонат натрия	25,0 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл
pH 8,4±0,1	

В холодную дистиллированную воду погружают пептон, хлорид и карбонат натрия. Смесь кипятят при постоянном помешивании до полного растворения пептона, не допуская его пригорания, затем добавляют нитрат калия. Если нужно, pH доводят до 8,0±0,1. Раствор фильтруют через миткалевый или бумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют в автоклаве 20 мин при 1 атм.

Основной раствор пептона сохраняется до 2 лет.

1% пептонная вода.

Готовится из основного раствора пептона путем разведения его в 10 раз дистиллированной водой. После установления pH 8,5±0,1 разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют 20 мин при давлении 0,7 атм.

Пептонная вода с теллуридом калия.

В 1% ПВ (pH 8,5±0,1) после автоклавирования добавляют теллурид калия в разведении 1:100000 или 1:200000. Предварительно готовят рабочий 0,1% раствор теллурита калия (срок хранения 7 дней).

Срок хранения среды при 20-25°C 48 ч, 4°C – 10 дней.

4.1.2. Транспортные среды

1%-я пептонная вода, рН $8,5 \pm 0,1$ без ингибиторов роста сопутствующей флоры и с теллуридом калия (см. среды обогащения)

2% раствор поваренной соли:

20 г хлорида натрия и 0,1 г едкого натрия растворяют в 1000 мл дистиллированной воды; жидкость фильтруют через бумажный фильтр, разливают по 10 мл в пробирки и автоклавируют 20 мин при 0,7 атм.

4.1.3. Плотные среды для выделения холерного вибриона

Щелочной мясо-пептонный агар:

Мясная вода	1000,0 мл
Пептон	10,0 г
Хлористый натрий	5,0 г
Агар-агар	20,0 г
рН 7,6-7,8	

В мясную воду вносят пептон и хлорид натрия, перемешивают и подщелачивают 20% раствором едкого натра до рН 7,6-7,8. Добавляют агар-агар и помещают в автоклав для варки среды в начале текучим паром в течение 30-40 мин, а затем при 1 атм. 20 мин. Если мясо-пептонный агар варят на плите, среду кипятят до полного расплавления агар-агара при постоянном помешивании.

После варки среду оставляют на 2–3 ч в автоклаве или помещают в термальную комнату при $43 \pm 2^\circ\text{C}$. Лучше время отстоя среды продлить до 18-20 ч. Отстоявшийся агар осторожно сифоном или через край медленно сливают с осадка на плотный ватно-марлевый фильтр. Уточняют реакцию среды и при необходимости подкисляют (подщелачивать на этом этапе не рекоменду-

ется). Агар разливают в посуду и стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

Элективная среда СЭДХ, сухая:

Среда обладает выраженным элективным свойством, обеспечивая ингибицию сопутствующей микрофлоры (энтеробактерий, протей, кокков и др.) и практически не влияет на рост вибрионов.

Используется для выделения и дифференциации холерного вибриона (производства Ростовского противочумного НИИ)

Состав, г/л

Пептон D	6,0
Натрия карбонат	1,0
Препарат «ПТ»	2,0
Бромтимоловый синий	0,04
Агар	10,0
pH- 8,0 ± 0,2	

Сухую среду в количестве, указанном на этикетке, размешивают в 1000,0 мл дистиллированной воды, ставят на 15-20 мин для набухания агара. Затем на небольшом огне доводят до кипения, кипятят 5 мин при постоянном помешивании до полного расплавления агара. Цвет готовой среды темно-синий.

Среду, не фильтруя и не стерилизуя, разливают в стерильные чашки Петри слоем 4,0 – 5,0 мм. Чашки со средой можно хранить в течение 5 суток в холодильнике при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

Учет результатов проводят через 20 – 24 часа инкубации в термостате при 37°C .

Холерные вибрионы O1 и не O1 групп через 12–18 ч формируют на этих средах плоские, прозрачные колонии желтого цвета за счет ферментации сахарозы, диаметром 1-2 мм; *V. parahaemolyticus* - мелкие го-

лубоватые (цвета среды), с уплотненным центром; *V. alginolyticus* - крупные желтые колонии, *Pseudomonas*, *Aeromonas* - голубые, *Enterobacteriaceae* - очень мелкие плотные или полупрозрачные, иногда окрашены в желтый цвет; колонии протей, как правило, не роятся.

Модифицированная агаровая среда TCBS изготавливается ГНЦПМ (отделением «питательных сред»), г. Оболенск.

Среда В.Ф. Седук и др. (модификация среды TCBS):

Серноватистокислый натрий	10,0 г
Лимоннокислый натрий	10,0 г
Лимоннокислое железо	1,0 г
Желчь бычьей сухой	8,0 г
Сахароза	20,0 г
Углекислый натрий (безводный)	6,0 г
Бромтимоловый синий	0,04 г
Тимоловый синий	0,04 г
Агар питательный щелочной сухой	50,0 г
Вода дистиллированная	1000,0 мл

Все компоненты среды растворяют в 1000 мл дистиллированной воды. Смесь доводят до кипения, но не кипятят. Готовую среду без стерилизации разливают в чашки Петри, цвет среды зеленый. Характеристику среды см. 1.3.2.

Среда Монсура в модификации Т.Н. Донской, Л.Ф. Зыкина.

Агар Хоттингера 1,5%	1000,0 г
Желатина	50,0 г

Желчь бычья 50,0 г
рН 7,5±0,1

Среду стерилизуют текучим паром или при 110°C в течение 15 мин. Перед употреблением добавляют теллурид калия в концентрации 1:100000.

Готовая среда бесцветная, слегка мутная. Холерный вибрион вырастает на ней через 24 ч в виде сероватых слизистых колоний с темным центром. Через 48 ч центр колоний окрашивается в интенсивно черный цвет. По краю колоний - просветление среды.

4.1.4. Среды с углеводами для отбора колоний

Лактозно-сахарозная среда:

Пептон	5,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Лактоза	10,0 г
Сахароза	1,0 г
Агар-агар	10,0 г
Индикатор Андрее	40,0 мл
Вода дистиллированная	1000,0 мл
рН 7,3±0,1	

Среду варят, фильтруют, разливают по 5-7 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при давлении 0,5 атм. 20 мин. После стерилизации среду скашивают, чтобы получить столбик и косяк.

Агаровую культуру сеют бактериологической петлей по скошенной поверхности затем в центр столбика. Среда светлая, при кислотообразовании краснеет.

4.1.5. Среды для идентификации

Среды Гисса:

К 100 мл 1% пептонной воды (рН 7,3±0,1) без селитры добавляют 0,5-1% необходимого углевода или

спирта (l-арабиноза, d-манноза, d-сахароза, d-маннит, l-инозит, d-глюкоза, растворимый крахмал и др.) и 1% индикатора Андрее или 0,1 мл 1,6% раствора бромтимолового синего.

Среды разливают в стерильные пробирки с поплавками и стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин; среду с l-арабинозой следует стерилизовать в течение 20 мин при 0,1-0,2 атм. Готовые среды с индикатором Андрее светлые, при кислотообразовании краснеют; с бромтимоловым синим - зеленого с травянистым оттенком, при кислой реакции - желтого цвета, при щелочной - синего.

Среды Гисса применяют при изучении ферментации углеводов и спиртов. Культуру выращивают в течение 18-20 ч на плотной или 3-4 ч на жидкой питательных средах и засевают в среды Гисса. Посевы инкубируют при 37°C и учет результатов через 6-18 ч.

Среда Хью-Лейфсона:

Пептон	2,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Двузамещенный фосфат калия	0,3 г
Глюкоза	10,0 г
Бромтимоловый синий	0,03 г
Агар-агар	3,0 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл
pH 7,1±0,1	

К воде добавляют пептон, хлористый натрий и агар-агар. Смесь подогревают до расплавления агара, затем вносят фосфат калия и глюкозу, продолжают кипятить 2-3 мин. Смесь подщелачивают 20%-ным раствором едкого натрия до pH 7,4±0,1, доводят объем среды до первоначального и добавляют 3 мл 1%-ного водного

раствора бромтимолового синего. Затем среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 4-5 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при давлении 0,5 атм. 20 мин. Цвет среды до стерилизации синий, а после автоклавирования травянисто-зеленый (рН 7,1±0,1). При кислой реакции среда желтеет.

Среда Хью-Лейфсона используется для определения типа расщепления глюкозы (окисления-ферментацион-тест).

Бульон Кларка:

Пептон	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Двузамещенный фосфат калия	5,0 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Смесь ингредиентов нагревают до полного их растворения, затем фильтруют через бумажный фильтр и разливают по 5 мл в стерильные пробирки. Бульон стерилизуют при давлении 0,5 атм. 20 мин.

Среда Кодама:

В 1% пептонную воду добавляют 0,5% растворимого крахмала. Среду разливают в стерильные пробирки и стерилизуют 20 мин под давлением 0,5 атм. Для определения результатов расщепления крахмала используют реактив Люголя.

4.1.6. Среды для определения декарбоксилаз и дигидролаз аминокислот.

Среда пептонно-дрожжевая:

Пептон	5,0 г
Дрожжевой экстракт	25,0 мл (сухой 3,0 г)
Глюкоза	1,0 г

Хлористый натрий	5,0 г
Карбонат натрия (без- водный)	0,1 г
Бромтимоловый синий (0,1%-ный р-р в 20%- ном спирте)	45,0 мл (0,045 г сухого)
Аминокислота (соответствующая)	10,0-20,0 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл
рН	6,4±0,1

Все ингредиенты по прописи вышеуказанной среды растворяют при нагревании, устанавливают рН 6,4±0,1 затем добавляют соответствующий индикатор и делят среду на 4 равные части. В одну часть аминокислоту не добавляют, эта порция служит контролем. В остальные порции вносят соответственно: в первую - 1% лизина, во вторую - 1% орнитина, в третью - 1% аргинина. Аминокислоты должны быть в l-форме, если имеются d-аминокислоты, то добавляют 2%, т.к. микроорганизмы активны только в отношении l-форм. После добавления аминокислот перед стерилизацией, в случае необходимости, реакцию среды исправляют 0,1 раствором соляной кислоты. Среду разливают по 1-2 мл в химически чистые стерильные пробирки и стерилизуют при давлении 0,1-0,2 атм. 20 мин. Небольшое количество флоккулята в средах не имеет значения. Пептонно-дрожжевая среда имеет травянисто-зеленый цвет, при кислой реакции среда желтеет, при щелочной - синет.

Мясопептонный бульон: мясная вода с 1% сухого пептона и 0,85% поваренной соли. Смесь кипятят до пол-

ного растворения пептона и соли, устанавливают нужную реакцию среды, стерилизуют при 0,7 атм. 20 мин.

4.2. РЕАКТИВЫ

4.2.1. Для определения индолообразования

Реактив Эрлиха:

Парадиметиламинобензальдегид	1,0 г
Этиловый спирт	95,0 мл
Концентрированная соляная кислота	20,0 мл

Альдегид растворяют в спирте, затем добавляют кислоту, смешивают. Хранят в темном месте.

Полоски фильтровальной бумаги пропитывают насыщенным раствором щавелевой кислоты и высушивают в термостате.

4.2.2. Для выявления образования сероводорода

Полоски фильтровальной бумаги пропитывают раствором уксусно-кислого свинца. Подсушивают на воздухе.

Полоски индикаторных бумажек на индол и сероводород помещают под пробку пробирки с засеянной культурой. В случае образования сероводорода в процессе выращивания бактерий полоска чернеет, при образовании индола – краснеет.

4.2.3. Для определения индофенолоксидазы:

Готовые коммерческие СИБ тест-полоски разных производителей.

4.3. КОНСЕРВАНТЫ

4.3.1. Для сохранения дефибринированной крови

С борной кислотой:

Борная кислота	40,0 г
Глюкоза	50,0 г
0,9% раствор натрий хлорида	до 1000,0 мл

Стерилизуют на водяной бане или текучим паром при 100°C по 20 мин в течение 3 дней, 100 мл дефибрилированной крови барана соединяют с 15 мл консерванта с борной кислотой.

4.4. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПЛОТНЫХ И ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Щелочной агар и основной раствор пептона, приготовленные из сухих питательных сред производственного выпуска, проверяются с использованием одного тест-штамма (*V. cholerae cholerae* P-1 145 или *V. cholerae* не O1 P-9741).

Используется 3-часовая агаровая культура тест-штамма 3-го пассажа. Агар разливается за 30-40 мин до посева (без подсушивания). Из выросшей культуры готовится взвесь вибрионов в 0,9% растворе хлористого натрия (рН 7,2) в концентрации 1 млрд. м.к. в 1 мл (по стандарту мутности 5 единиц ГИСК им. Л.А. Тарасевича), которая последовательно разводится, перенося по 0,5 мл в 4,5 мл 0,9% хлористого натрия до концентрации 1000 м.к. в 1 мл (разведение 10³).

Для контроля щелочного агара 100 м.к. тест-культуры (0,1 мл из разведения 10³) засеваются на три свежерозлитых (по 25-30 мл) и тщательно подсушенных чашек проверяемой и контрольной сред. Посевной материал распределяется покачиванием. Посевы инкубируются при 37±1°C в течение 12 ч.

Проверяемые плотные питательные среды считаются пригодными для выделения возбудителя холеры, если после 12 ч на чашках вырастает не менее 30% от расчетной посевной дозы (100 м.к.) типичных по морфологии колоний диаметром не менее 1 мм и не менее 70% от количества выросших колоний на контрольной среде.

Основной раствор пептона производственного выпуска, подлежащий проверке и используемый в качестве контрольной среды, разводится до 1% концентрации, устанавливается рН $8,3 \pm 0,1$ и разливают в 6 колб или флаконов по 100 мл (3 – для опытной и 3 – для контрольной). Во все объемы испытуемой и контрольной среды вносится по 100 м.к. тест-культуры (0,1 мл из разведения 10^3). Для контроля посевной дозы проводится высеивание посевной культуры на 3 агаровые пластинки. На одной чашке должно вырасти (в среднем) не менее 30 и не более 70 колоний.

Посевы инкубируются в течение 6 ч при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с последующим высеиванием из поверхностного слоя каждого объекта бактериологической петлей № 5 (5мм) на агаровые пластинки контрольной среды. После выращивания посевов при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 12-14 ч учитываются результаты:

Проверяемый основной раствор пептона считается пригодным для выделения возбудителя холеры, если на всех агаровых пластинках вырастают не менее 10 типичных по морфологии колоний диаметром не менее 1 мм.

4.5. ПРОВЕРКА КАЧЕСТВА ТЕЛЛУРИТА КАЛИЯ (ТК)

Порядок приготовления и хранения 1%-й пептонной воды с теллуридом калия.

Приготовление рабочих растворов. Теллурид калия выпускается промышленностью в виде сухого порошка или 2%-го раствора. Каждая серия препарата,

используемого для приготовления питательных сред при диагностике холеры, должна быть проверена на ингибирующие свойства в отношении холерного вибриона и кишечной палочки. В работе используют 0,025% (1:4000) раствор теллурита калия. Для его приготовления к 5 мл 2%-го раствора добавляют 395 мл стерильной дистиллированной воды. Из сухого препарата рабочий раствор готовят разведением 50,0 мг теллурита калия в 200 мл стерильной дистиллированной воды.

Хранение теллурита калия и его рабочих растворов. Сухой порошок хранят в темном месте при комнатной температуре. Срок годности не ограничен. Концентрированный или 2%-й раствор теллурита калия хранят в темном месте в герметично закрытой посуде. Срок годности не более 4 лет.

Рабочий раствор теллурита калия хранят в холодильнике и используют в течение 7 дней после приготовления. Почернение или помутнение растворов свидетельствует об их непригодности.

Проверка годности теллурита калия проводится лабораториями, имеющими разрешение на работу с ПБА I и II групп.

4.6. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СВОЙСТВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

4.6.1. Биохимические свойства

Определение индофенолоксидазы

Для постановки пробы на оксидазу можно использовать специальные диски из набора СИБ, пропитанные одним из реактивов. Культура наносится на диск платиновой петлей (но не хромникелевой) или стеклянной палочкой и распределяется в виде небольшого пятнышка. Через 10-30 секунд появляется окрашивание

(красное или синее, в зависимости от примененного при изготовлении диска реактива), свидетельствующее о положительной реакции. Параллельно используется культура кишечной палочки, которая не даёт окрашивания.

Из грамотрицательных бактерий положительную пробу на индофенолоксидазу дают вибрионы, аэромонады, псевдомонады, плезиомонады, а отрицательную – все энтеробактерии семейства *Enterobacteriaceae*.

Не следует ставить пробу на оксидазу с культурами на полиуглеводных средах, а также с колониями на элективных средах (СЭДХ и ТСBS).

Определение типа расщепления глюкозы (тест Хью-Лейфсона)

В две пробирки со средой Хью-Лейфсона засеваются уколом в столбик изучаемой культурой. Поверхность среды в одной из пробирок покрывается 0,5-1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируются от 1 до 4 суток при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Окисление определяется по желтой окраске среды только в аэробных, а ферментация - в аэробных и анаэробных условиях роста. Вибрионы расщепляют глюкозу по ферментативному типу.

Определение декарбоксилазной и дигидролазной активности

Определение декарбоксилазной активности проводится на специальных средах Мюллера, Фалькоу, Биргер-Крушинской, Ряпис и др. (среда 199). В пробирки с лизином, орнитиним, аргинином и контролем (среда без аминокислоты) засеваются по полной бактериологической петле 18-часовой агаровой культуры. Посевы

инкубируются при $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Учет результатов производится ежедневно, при отрицательном результате - до 1-4 суток. В результате ферментации глюкозы вначале происходит сдвиг pH в кислую сторону, а в дальнейшем при декарбоксилировании аминокислот накапливаются амины и происходит защелачивание среды.

Среда Мюллера фиолетового цвета, при кислой реакции желтеет, щелочной – изменяется до красно-фиолетового цвета. Среда Фалькоу имеет травянисто-зеленый цвет, при кислой реакции желтеет, при щелочной - синееет. Среда Биргер-Крушинской при положительной реакции изменяется в синий цвет, среда Ряпис и др. меняется от оранжевого до сиреневого.

Ферментацию углеводов и многоатомных спиртов (глюкоза, лактоза, манноза, сахароза, арабиноза, маннит, салицин, дульцит, инозит, крахмал и др.) определяют в жидких или полужидких средах Гисса с индикатором бромтимоловым синим, Андрее.

Для посева используется культура, выращенная в течение 12-20 ч на плотной или 3-4 часа в жидкой питательной средах. Посевы на средах с углеводами и спиртами инкубируются при $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Результаты учитываются через 6-18 ч.

Определение диастатической активности: могут быть использованы среда Гисса с крахмалом и среда Кодама. Культура засеивается в среду и инкубируется при $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Через 18 ч в пробирку со средой Кодама добавляется 2-3 капли раствора Люголя. При разложении крахмала среда не окрашивается.

Выявление способности к билюминесценции

Исследуемые штаммы засеиваются в 1% пептонную

воду или на пластинки щелочного агара, инкубируются при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ч. Выросшие культуры просматриваются в темной комнате. Свечение наблюдается после 5-10 мин адаптации в темноте.

Определение протеолитической активности

Протеолитические свойства выявляют путем посева уколом в столбик желатины 18-часовой агаровой культуры. Посевы инкубируют при температуре $(37,0\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ в течение 18 часов. Перед учетом результатов пробирки помещают в холодильник на 20 минут. При положительном результате желатина остается жидкой, а при отрицательном (и в контрольной пробирке) – затвердевает.

4.6.2. Серологические методы

Слайд-агглютинация

Слайд-агглютинация ставится на обезжиренном стекле, помещенном в чашку Петри, используя подозрительную на холерный вибрион колонию и/или агаровую 12-18-часовую культуру и холерные сыворотки O1 серогруппы (Инаба, Огава в разведениях 1:50) и O139 (в разведении 1:10)

Сыворотка O139 разводится в соответствии с указанием на этикетке. Реакция обязательно сопровождается контролями культуры в физиологическом растворе.

Развернутая реакция агглютинации.

Развернутая реакция агглютинации ставится и учитывается по общепринятой методике в соответствии с наставлением к диагностическим сывороткам в объеме 1 мл, начиная с разведения 1:100 до титра сыворотки, применяя в качестве антигена 1 млрд. суспен-

зию холерных вибрионов в 0,9% растворе хлористого натрия. Для РА с РО сывороткой антиген готовится на дистиллированной воде.

Для исключения спонтанной агглютинации рекомендуется ставить развернутую реакцию в 0,3% растворе NaCl. Диагностические сыворотки двукратно разводятся 0,3% раствором натрия хлорида в объеме 0,5 мл соответственно величине диагностического титра. Суспензия изучаемой культуры готовится в этом же растворе с концентрацией 3-5 млрд м.к./мл в объеме 8-10 мл. Взвесь выдерживают при комнатной температуре в течение 1-1,5 ч. В реакции используется поверхностный слой микробной взвеси, разведенной 0,3% раствором натрия хлорида до концентрации 1 млрд м.к./мл, добавляя её по 0,5 мл во все разведения сыворотки и контроль культуры (0,5 мл 0,3% раствора натрия хлорида + 0,5 мл взвеси культуры). Учет и оценка результатов аналогичны основному варианту развернутой реакции.

Флуоресцентно-серологический метод исследования (МФА)

Чувствительность метода – 10^6 м.к. в 1 мл.

Из нативного материала (жидких испражнений и рвотных масс), пленки I-ой и II-ой накопительной среды готовят мазок, подсушивают его на воздухе и фиксируют 20 мин в 96° этиловом спирте без последующего обжигания. Мазок помещается в чашку Петри с влажной фильтровальной бумагой или ватой и на мазок наносится капля люминесцирующей сыворотки в рабочем разведении. При исследовании сильно загрязненных материалов с целью гашения неспецифического свечения люминесцирующая сыворотка разводится бычьим альбумином, меченым родамином или нормальной лошадиной сывороткой.

Через 15-20 мин экспозиции при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ или комнат-

ной температуре мазок промывается в течение 10 мин в забуференном физиологическом растворе или 5 мин в проточной водопроводной воде, прополаскивается в дистиллированной воде и высушивается на воздухе.

На мазок наносится небольшая капля забуференного глицерина (9 частей глицерина и 1 часть фосфатного буфера, рН 7,2-7,4) и накрывается покровным стеклом. При просмотре препаратов в люминесцентном микроскопе пользуются нефлуоресцирующим иммерсионным маслом или диметилфтолатом. Положительно оценивается интенсивное желто-зеленое свечение по периферии клетки (++++ или +++).

Этот метод может быть использован и для идентификации подозрительных колоний на любом этапе исследования. Для выявления холерных вибрионов O139 серогруппы можно использовать непрямой метод иммунофлуоресценции.

Реакция иммобилизации вибрионов (РИВ)

Чувствительность метода иммобилизации вибрионов под влиянием холерной O1-сыворотки – $4,3 \cdot 10^5$ м.к. в 1 мл.

На предметное стекло наносится 2 капли исследуемого материала (испражнений, верхнего слоя I-ой или II-ой среды обогащения). Первая капля накрывается покровным стеклом (контроль), ко второй - добавляется капля холерной O1-сыворотки в разведении 1:50, перемешивается и накрывается покровным стеклом. Раздавленные капли просматриваются под микроскопом при увеличении 400-600х, используя фазово-контрастное устройство или конденсор темного поля.

При наличии в исследуемом материале холерных вибрионов в первой капле наблюдается характерная подвижность, во второй – подвижность вибрионов прекращается немедленно или в течение 1-2 мин.

Для определения принадлежности холерного вибриона к серовару можно пользоваться сыворотками Инаба и Огава в разведении 1:50. Реакция иммобилизации специфична и позволяет дать первый сигнальный ответ через 15-20 мин от начала исследования нативного материала. При отрицательном результате исследование повторяют после подращивания в 1% пептонной воде.

В случае отрицательного результата необходимо провести аналогичное исследование с холерной сывороткой O139 серогруппы в разведении 1:5.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА) с диагностикумом холерным эритроцитарным O-иммуноглобулиновым в микрообъемах.

Материалом для исследования служат испражнения от больных клинической формой холеры, содержимое кишечника трупов лиц, умерших с подозрением на холеру, посевы I-ой или II-ой сред обогащения. Исследуемый материал обязательно инактивируют кипячением на водяной бане 20 мин и при необходимости фильтруют через бумажный фильтр.

При исследовании серологическим методом испражнений, рвотных масс, желчи от больных с подозрением на холеру используется II-ая пептонная вода.

При исследовании испражнений от лиц, контактировавших с больными, декретированных и других контингентов на вибриононосительство, а также объектов внешней среды используется II-ая пептонная вода для постановки РНГА в одной лунке. При получении положительных результатов ставятся РНГА и РТНГА в развернутых рядах.

Постановка РНГА. В 8 лунок микротитровальных пластинок вливается 2 капли (0,05 мл) 0,9% раство-

ра хлористого натрия. Затем в первую лунку вливается 0,05 мл инактивированного исследуемого материала и титруется по 0,05 мл во всех лунках, кроме последней.

Получается ряд последовательных двукратных разведений. Затем во все лунки добавляется по 0,025 мл диагностикума холерного эритроцитарного О-иммуноглобулинового 0,6% концентрации (дополнительно разведенного в 4 раза) и пластинки оставляются на 2 ч при комнатной температуре, после чего проводится учёт результата. Он считается положительным при равномерном выпадении эритроцитов на дно лунок. В отрицательных случаях эритроциты выпадают на дно лунок в виде «пуговки».

Проверка специфичности положительного результата РНГА осуществляется при помощи РТНГА.

Постановка РТНГА. В лунки микротитровальных пластинок вливается по 0,025 мл 0,9% раствора хлористого натрия. Затем в первую лунку вливается 0,025 мл исследуемого материала и титруется. Из последней лунки 0,025 мл удаляется. После этого во все лунки добавляется 0,025 мл сыворотки холерной О1 в разведении 1:50. Пластинки оставляются на 1 ч при комнатной температуре, затем во все лунки добавляется по 0,025 мл диагностикума холерного эритроцитарного О-иммуноглобулинового 0,6% концентрации и учёт результатов проводится через 2 ч после добавления диагностикума. В РТНГА реакция должна быть отрицательной. Допускается положительный результат РТНГА в первых разведениях. При сравнении титров РТНГА и РНГА (в случае одновременной постановки реакций) положительный результат в РНГА должен быть на 4-5 лунок выше, чем в РТНГА.

4.6.3. Тесты дифференциации биоваров *V. cholerae* O1 серогруппы

Определение чувствительности к диагностическим холерным фагам

В лабораторной диагностике холеры используются бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор. При оценке результатов проб с фагами необходимо ориентироваться на диагностический рабочий титр (ДРТ), который обычно обозначаются на этикетках. Определение чувствительности к фагам проводится как с цельными препаратами, так и с их 10-кратными разведениями до ДРТ в мясо-пептонном бульоне. Дифференциальный рабочий титр обычно не ниже 1×10^2 .

Для постановки реакции в чашки разливается щелочной агар. После застывания агара и подсушивания его в течение 30 мин при 37°C дно чашек делится на квадраты по количеству образцов фагов и 10-кратных разведений фага. В пробирку с 5 мл 0,5-0,7% питательного агара, расплавленного и охлажденного до 45°C , добавляется 0,1-0,2 мл 3-4-часовой бульонной культуры, тщательно смешивается и выливается на поверхность агара. Чашки оставляются при комнатной температуре с приоткрытыми крышками на 30 мин. В центр квадратов наносятся штампом-репликатором, стандартной петлей или тонко оттянутой пастеровской пипеткой по капле фагов в соответствующих разведениях. После подсыхания капель чашки переворачиваются вверх дном и помещаются в термостат при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Учет результатов через 2-4 ч и 18-20 ч. Наличие лизиса в виде одного «стерильного» пятна или группы мелких негативных колоний оценивается как положительный результат.

Определение чувствительности к полимиксину

В расплавленный и остуженный до 45°C питательный агар (рН 7,2±0,1) добавляется полимиксин В из расчета 50 единиц на 1 мл среды. После тщательного перемешивания среда разливается в чашки Петри. На застывшие агаровые пластинки наносится обычной бактериологической петлей или штампом – репликатором 3 или 18 часовая бульонная культура. Учет результатов после инкубирования посевов при 37°C в течение 18 ч. Холерный вибрион биовара *cholerae* не растёт на полимиксиновом агаре, биовара *eltor* - по-разному.

Постановка реакции гемагглютинации

На предметное стекло, помещенное в чашку Петри наносится капля физиологического раствора и суспендируется петлей 18-часовая агаровая культура. Затем добавляется капля 2,5% взвеси куриных эритроцитов, трижды отмытых физиологическим раствором. Стекло покачивается до смешивания взвеси эритроцитов и вибрионов. При положительной реакции в течение 1 мин наступает склеивание эритроцитов. Реакция сопровождается двумя контролями: а) в каплю физиологического раствора добавляется капля 2,5% взвеси эритроцитов; б) в капле физиологического раствора суспендируется испытуемая культура. Контроли должны быть отрицательными. Для постановки пробы могут быть использованы эритроциты морской свинки.

Постановка реакции Фогес-Проскауэра (на ацетилметилкарбинол)

Испытуемая культура засеивается в глюкозо-фосфатный бульон Кларка и инкубируется при температуре 37 ± 0,5°C в течение 1-3 суток. Затем к 1 мл культуры

добавляется 0,6 мл 6% спиртового раствора а-нафтола и 0,4 мл 40% раствора едкого калия. Пробирки встряхиваются и помещаются в термостат на 1 ч. При положительной реакции среда окрашивается в розовый или ярко-красный цвет.

4.6.4. Тесты межвидовой дифференциации патогенных для человека вибрионов

Определение галофильности вибрионов

Суточная агаровая культура исследуемого штамма засеивается в 1% пептонную воду с 3% NaCl. Через 3-4 ч инкубации при 37°C делают перенос строго по 1 капле выросшей культуры в пептонную воду без NaCl, с 7 и 10% NaCl. Через 18-20 ч инкубации оценивается рост культур по помутнению среды. Галофильные вибрионы не растут на средах, не содержащих NaCl.

К негалофильным относятся *V. cholerae*, *V. cholerae* не O1 группы, *V. mimicus*, *V. metshnikovii* для роста которых достаточны следовые количества соли в среде.

4.6.5. Оценка эпидемической значимости холерных вибрионов

Определение гемолитической активности (по Грейгу)

К 1 мл 18-24-часовой культуры, выращенной в 4-5 мл мясо-пептонного бульона или сердечно-мозгового инфуза, добавляется 1 мл 1% взвеси трижды отмытых эритроцитов барана в физиологическом растворе. Смесь микробов и эритроцитов осторожно перемешивается встряхиванием и помещается на 2 ч в термостат при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, а затем в холодильник до следующего дня. Предварительный учет результатов проводится через 2 ч, окончательный – на следующий день. При положительной реакции наступает полный или частичный лизис эритроцитов (лаковая кровь). В

контроле (1 мл бульона+1 мл взвеси эритроцитов) гемолиз отсутствует. Чистоту опыта следует контролировать путем высева «смеси» на агаровую среду.

Для постановки пробы Грейга может быть использована дефибринированная кровь барана, консервированная борной кислотой. Консервированные эритроциты сохраняют свои свойства в течение 3-х месяцев. Перед постановкой пробы на гемолиз дефибринированную кровь центрифугируют при 2-3 тыс. оборотов/мин в течение 15 мин, надосадочная жидкость удаляется, а осевшие эритроциты отмываются физиологическим раствором 2–3 раза с промежуточным центрифугированием до получения прозрачной надосадочной жидкости. Из отмытых эритроцитов готовится 1% взвесь в физиологическом растворе, которую можно хранить при 4°C 2–3 дня и использовать для постановки пробы Грейга описанным выше способом.

Определение эпидзначимости холерных вибрионов эльтор комплексным методом

Определение производится с помощью диагностических холерных бактериофагов эльтор СТХ⁺ и СТХ⁻ в соответствии с наставлением к препаратам и гемолитической активности.

Методику определения гемолитической активности см. выше.

Для постановки пробы с фагом используют метод агаровых слоев. Испытуемая культура в объеме 0,5 мл добавляется пипеткой в пробирку с 5,0 мл 0,5-0,7% агара Мартена рН 7,6±0,2, расплавленного и охлажденного до 45 ± 0,2°C. После перемешивания все содержимое выливается на подсушенную поверхность агара Мартена (рН 7,6 ± 0,2) в чашки Петри. После застывания слоя агара с культурой на его поверхность наносятся

цельные фаги СТХ⁺ и СТХ⁻. После высыхания капель фагов чашки переворачивают агаром вверх и инкубируют при 37±0,5°C.

По лизису фагами и гемолитической активности в пробе Грейга исследуемые штаммы могут быть отнесены к эпидемически опасным (I группа, вариант 1) и эпидемически неопасным (III группа, вариант 6, 7, 8) вариантам или требующим дополнительных исследований для заключения об их эпидемичности (группа II, варианты 2, 3, 4, 5) (табл. 3).

Определение эпидемической значимости *V. cholerae* в ПЦР с электрофоретическим учетом результатов

Для оценки эпидемической значимости выделенной культуры *V. cholerae* или обнаружения ДНК токсигенного штамма в исследуемом материале применяется «Тест-система для выявления ДНК *V. cholerae* (*ctxA*+) методом полимеразной цепной реакции (ГенХол)».

Применение данной тест-системы обеспечивает выявление фрагмента гена субъединицы А холерного токсина *ctxA* размером 564 п.н.

Обеззараживание исследуемого материала и выделение ДНК

При исследовании чистой культуры *V. cholerae* готовится бактериальная взвесь 18-часовой агаровой культуры в 0,9% растворе натрия хлорида по стандартному образцу мутности 5 единиц ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора. Далее проводятся 10-кратные разведения до концентрации взвеси 1x10⁷ м.к./мл. Для обеззараживания добавляется мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01%) и взвесь прогревается при 56 °С в течение 30 мин. Экстракция ДНК из обеззараженной взвеси осуществляется посредством

прогревания на водяной бане при 100 °С в течение 30 мин или с использованием стандартного набора для выделения ДНК в соответствии с инструкцией производителя.

Постановка ПЦР

В отдельной пробирке готовится общая амплификационная смесь (исследуемое количество проб и две контрольных пробы) из расчета нижеуказанного количества компонентов на одну пробу:

Дистиллированная вода – 6,75 мкл

10хПЦР буфер – 2,5 мкл

дНТФ – 2,5 мкл

MgCl₂ – 1,0 мкл

Праймер ctx2 – 1,0 мкл

Праймер ctx3 – 1,0 мкл

Taq- полимераза – 0,25 мкл

Смесь перемешивается пипетированием и распределяется по 15 мкл в промаркированные пробирки.

Далее в пробирку отрицательного контроля вносится 10 мкл дистиллированной воды, в пробирку положительного контроля – 10 мкл контрольной ДНК, в остальные пробирки – по 10 мкл исследуемых проб. При использовании амплификатора, не имеющего режима нагревания крышки, в пробирки перед добавлением ДНК вносится по 30 мкл минерального масла для предотвращения испарения амплификационной смеси.

Амплификация проводится в термоциклере по следующей программе:

стартовая денатурация 94°С - 5 мин

далее 35 циклов:

95°С - 30 сек

60°С - 30 сек

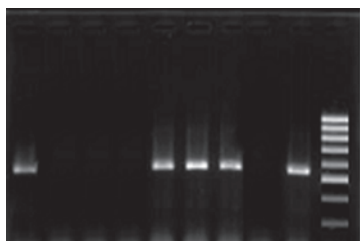
72°С - 30 сек

заключительная элонгация 72 °С - 7 мин.

Учет и оценка результатов амплификации

По окончании программы амплификации анализируемые образцы в объеме 10-12 мкл смешиваются с 2-2,5 мкл раствора для нанесения проб и вносятся в лунки агарозного геля плотностью 1,5%. Электрофорез проводится в 1×TBE-буфере в присутствии бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл, при напряженности 10 В/см в течение 30-40 мин. Затем гель просматривается в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе и результат видеодокументируется.

Аmplифицированные фрагменты идентифицируют по размеру, сравнивая флуоресцирующие в геле полосы анализируемых образцов с полосами положительного контроля или в соответствии с маркером молекулярного веса. Проба с положительным контролем должна содержать амплифицированный фрагмент 564 п.н., проба с отрицательным контролем не должна иметь флуоресцирующих фрагментов в геле. Штаммы, в пробах ДНК которых обнаруживается ампликон размером 564 п.н., соответствующий фрагменту гена *ctxA*, расцениваются как эпидемически опасные (рис 6).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Рис. 6 Электрофореграмма продуктов амплификации гена *ctxA* (1, 5-7 *ctxA*⁺ пробы – эпидемически опасные штаммы; 2-4 *ctxA*⁻ пробы – эпидемически неопасные штаммы; 8 – отрицательный контроль; 9 – положительный контроль; 10 – маркер молекулярного веса GeneRuler™ 100bp DNA Ladder)

Идентификация и оценка эпидемической значимости *V. cholerae* методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Идентификация и оценка эпидемической значимости *V. cholerae* методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» проводится с использованием «Набора реагентов для выявления ДНК *V. cholerae* и идентификации патогенных штаммов *V. cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс *Vibrio cholerae* -FL»)).

Подготовка проб и выделение ДНК проводится как описано выше и в соответствии нормативно-методическими документами.

Постановка реакции осуществляется в мультиплексном формате в двух пробирках:

1 пробирка - ПЦР-смесь-1-FRT *V. cholerae* «Скрин»:

- *ctxA* (ген субъединицы А холерного токсина) - выявление патогенных штаммов, оценка эпидемической значимости (FAM/Green)
- ВКО – внутренний контроль (JOE/Yellow)
- *tcpA* (ген основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии) - выявление патогенных штаммов, оценка эпидемической значимости (Rox/Orange)

2 пробирка - ПЦР-смесь-1-FRT *V. cholerae* «Тип»:

- *wbeT* (ген O1 антигена) – принадлежность к O1 серогруппе (FAM/Green)
- *hlyA* (ген гемолизина) – идентификация ДНК холерного вибриона всех серогрупп (JOE/Yellow)
- *wbfR* (ген O139 антигена) – принадлежность к O139 серогруппе (Rox/Orange)

Отбирается необходимое количество пробирок с

ПЦР-смесью-1-FER/FRT *V. cholerae* скрин и ПЦР-смесь-1-FER/FRT *V. cholerae* тип для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. На поверхность воска в пробирки добавляется по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL. Далее вносится по 10 мкл ДНК исследуемых и контрольных проб (отрицательный контроль (К-) - 10 мкл ДНК-буфера), положительный контроль (К+скрин) – 10 мкл ПКО ДНК *V. cholerae* скрин, **положительный контроль (К+тип) – 10 мкл ПКО ДНК *V. cholerae* тип, положительный контроль (BK+) – в пробирку с ПЦР-смесью-1-FER/FRT *V. cholerae* скрин** вносится 10 мкл ПКО BK).

Реакция проводится на амплификаторе «Rotor-Gene» 3000 или «Rotor-Gene» 6000 по следующим параметрам:

Удержание температуры 95 °С - 5 мин

Циклирование 95 °С - 10 с; 60 °С - 25 с; 72 °С - 10 с

Количество циклов – 10

Циклирование 2 95 °С - 10 с

56 °С - 25 с - детекция

72 °С - 10 с

Количество циклов – 35

Флуоресценция измеряется при 56 °С (во втором блоке циклирования) на каналах FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange.

Учет и анализ результатов

Анализ результатов амплификации с ПЦР-смесью-1-FER/FRT *V. cholerae* скрин:

установить значение Порог Фона– 10%.

для канала FAM/Green выставить Threshold/Порог = 0.05.

для канала JOE/Yellow выставить Threshold/Порог = 0.05.

для канала ROX/Orange выставить Threshold/Порог = 0.1.

Анализ результатов амплификации с ПЦР-смесью-1-FER/FRT *V. cholerae* тип:

установить значение Порог Фона – 10%.

для канала FAM/Green выставить Threshold/Порог = 0.1.

для канала JOE/Yellow выставить Threshold/Порог = 0.05.

для канала ROX/Orange выставить Threshold/Порог = 0.1.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (рисунок 7).

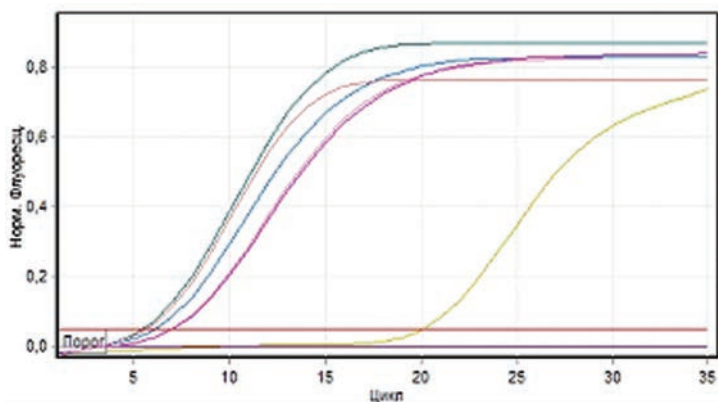


Рис. 7 Кривые флуоресценции исследуемых проб по каналу FAM/Green

Результат анализа считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК.

Образец считается положительным по искомой мишени, если в таблице результатов пороговых циклов (*Ct*) по соответствующему каналу, например, FAM/Green («*Quant. Resultes – Cycling A. FAM/Green*»), для

него определено значение *Ct*, не превышающее 33 (таблица 5).

Образец считается отрицательным по искомой мишени, если в таблице пороговых циклов по соответствующему каналу для него не указывается значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию – Threshold).

Таблица 5.

Оценка результатов анализа пцр с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Варианты	ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> скрин		ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> тип			
	Значение порогового <i>Ct</i> цикла по каналу					
	FAM/ Green (ctxA)	JOE/ Yellow (ВКО)	ROX/ Orange (tcpA)	FAM/ Green (O1)	JOE/ Yellow (<i>V.cholerae</i>) (hlyA)	ROX/ Orange (O139)
<i>V.cholerae</i> O1 токсигенный	< граничного значения	Любое значение или отсутствие	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 токсигенный	< граничного значения	Любое значение или отсутствие	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения
<i>V.cholerae</i> O1 НЕ токсигенный, но содержащий последовательность tcpA	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 НЕ токсигенный, но содержащий последовательность tcpA	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения

<i>V.cholerae</i> O1 HE токсигенный	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 HE токсигенный	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения
<i>V.cholerae</i> HE O1 и HE O139	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	< граничного значения	Нет значений
Холерные вибрионы HE обнаружены	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	Нет значений	Нет значений

Определение холерогенности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков.

Для заражения животных используют 4-часовую агаровую культуру, выращенную при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ или 18-часовую – при температуре $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Необходимо использовать две заражающие дозы 1×10^5 и 1×10^7 м.к.л., которые вводят внутрикишечно в объеме по 0,2 мл двум кроликам. Заражающую дозу контролируют путем высева на две чашки щелочного агара 0,1 мл взвеси из разведения 1×10^3 м.к.л./мл.

Кроликов 10-12 дней, весом 130-160 г фиксируют к станку брюшком вверх, выстригают шерсть на операционном поле и смазывают его йодом. Дают эфирный или внутримышечно тиопенталовый наркоз (0,2 мл 1% р-ра на 100 г веса). Делают разрез длиной 1 см по средней линии живота на уровне пупка. Извлекают петлю тонкого кишечника на длинной брыжейке, фиксируют с помощью мягкого пинцета и вводят взвесь вибрионов. Петлю погружают в брюшную полость. Брюшную стенку и кожу послойно зашивают. Шов смазывают йодом. Оперированных крольчат кормят с помощью шприца молоком и наблюдают 48 ч. Всех погибших и умерщвленных через 48 ч животных вскрывают и

производят высев содержимого кишечника на чашки щелочного агара.

Наиболее выраженные изменения наблюдаются в толстом кишечнике, который растянут бесцветной или светло-желтой, прозрачной или слегка опалесцирующей жидкостью. Слепая кишка и прилегающие отделы толстого кишечника могут быть настолько растянуты, что сквозь них видны подлежащие петли кишечника, что создает видимость полной прозрачности кишечного содержимого. Тонкий кишечник расширен и также заполнен полупрозрачным содержимым. Описанные изменения характерны для «синдрома холерогенности», наблюдаемого при заражении эпидемически опасными, содержащими ген холерного токсина штаммами.

4.6.6. Определение чувствительности холерных вибрионов к антибиотикам

Диско-диффузионный метод

Расплавленный агар Мюллера-Хинтона (АГВ или другая среда, прошедшие контроль качества питательных сред для определения антибиотикочувствительности) разливаются на строго горизонтальной поверхности в чашки Петри диаметром 100 мм по 25-30 мл или диаметром 150 мм по 60-70 мл.

Свежеприготовленные чашки подсушиваются при 37°C в течение 10-20 мин с приоткрытой крышкой.

Для приготовления инокулята используется 18-20-часовая агаровая или 3-4-часовая бульонная культура холерного вибриона. Суспензия или бульонная культура доводится до концентрации 10^9 м.к./мл и разводится в 10 раз изотоническим раствором хлорида натрия (10^8 м.к./мл). Приготовленный инокулят в количестве 1-2 мл наносится на поверхность среды, распределяется

покачиванием. Избыток жидкости удаляется пипеткой. Чашки подсушивают при комнатной температуре не более 10-15 мин и наносятся диски с антибиотиками с помощью автоматического диспенсора или стерильным пинцетом. На одну чашку помещается не более 6 дисков на расстоянии 15-20 мм от края чашки. Непосредственно после наложения дисков чашки в положении вверх дном инкубируются 14-18 ч при 37°C.

По окончании инкубации чашки помещаются на темную матовую поверхность вверх дном и проводится измерение зон задержки роста в отраженном свете (свет настольной лампы должен падать на поверхность чашек под углом 45°).

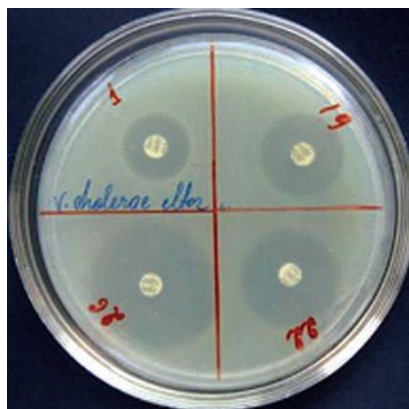


Рис 8 Диско-диффузионный метод определения чувствительности вибрионов к антибиотикам.

Не следует обращать внимание на очень мелкие колонии. Крупные колонии в пределах зоны ингибиции свидетельствуют о наличии посторонней микрофлоры или о гетерорезистентности популяции.

При оценке чувствительности к сульфаниламидам и их комбинации с триметопримом границу зоны ингибиции роста следует учитывать на уровне ингибиции роста на 80%.

Методы и критерии оценки антибиотикочувствительности холерного вибриона разработаны и стандартизированы для ампициллина, тетрациклина, доксициклина, ко-тримоксазола, хлорамфеникола. Для оценки чувствительности холерного вибриона к другим антибиотикам временно предлагается использовать методы и критерии оценки, разработанные для микроорганизмов семейства *Vibrionaceae* (табл. 4).

Метод серийных разведений в жидкой питательной среде
 Готовятся основные растворы антибиотиков в концентрации 1000,0 мкг/мл и выше в зависимости от их активности. Антибиотик растворяется дистиллированной воде или специальными для каждого антибактериального препарата веществами (табл. 6). В тех случаях, когда растворители и разбавители разные вещества, для солюбилизации антибиотика используется минимально возможное количество растворителя.

Таблица 6

Растворители и разбавители, используемые для приготовления основных растворов антибиотиков

1	2	3
Антибиотик	Растворитель	Разбавитель
Ампициллин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л pH 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л pH 6,0
Хлорамфеникол	95%-й этанол	Вода
Норфлоксацин Офлоксацин	1/2 объема воды, затем добавлять по каплям 0,1 моль/л раствор NaOH до растворения	Вода
Налидиксовая кислота	1/2 объема воды, затем добавлять по каплям 0,1 моль/л раствор NaOH до растворения	Вода
Нитрофурантоин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л pH 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л pH 8,0
Рифампин	Метанол	Вода

Сульфаниламиды	1/2 объема горячей воды и минимальное количество 2,5 моль/л раствора NaOH	Вода
Триметоприм	0,05N раствор соляной кислоты до 10% от конечного объема	Вода

Из основных растворов готовят рабочие двукратные концентрации, учитывая фактор разбавления антибактериального препарата в жидкой питательной среде 1:2.

Диапазон концентраций некоторых антибиотиков для оценки чувствительности микроорганизмов:

Аминогликозиды	0,03-128 мкг/мл
Ампициллин	0,25-128 мкг/мл
Цефотаксим	0,004-128 мкг/мл
Цефтриаксон	0,004-128 мкг/мл
Цефтазидим	0,004-128 мкг/мл
Хлорамфеникол	0,25-128 мкг/мл
Ципрофлоксацин	0,004-8 мкг/мл
Рифампин	2-32 мкг/мл
Тетрациклин	0,25-128 мкг/мл

Например, если необходимо изучить чувствительность культуры к тетрациклину, из основного раствора антибиотика готовят рабочий раствор: 256 мкг в 1 мл (1 мл основного раствора и 6,8 мл бульона).

Рабочий раствор антибиотика двукратно титруется в бульоне (МПБ, бульон Мартена или Хоттингера с содержанием Ca^{2+} 20-25 мг/л и Mg^{2+} 10-12,5 мг/л), pH 7,2-7,4 в объеме 1 мл. Для этого 1 мл жидкой питательной среды разливается стерильно в 11 пробирок, начиная со второй. Затем в первую и вторую пробирки вносится по 1 мл рабочего раствора антибиотика. Из второй пробирки 1 мл раствора переносится в следующую и так до предпоследней пробирки, из которой удаляется 1 мл жидкости. Последняя пробирка служит контролем роста культуры. Для каждого разведения анти-

биотика используется отдельная пипетка.

В каждую пробирку вносится 1 мл суточная агаровая или 3-4-часовая бульонная культура, разведенная до 10^6 вибрионов в 1 мл. При этом антибиотик разводится еще в 2 раза, следовательно, его концентрация в первой пробирке будет 128 мкг/мл. Пробирки инкубируются при 37°C в течение 16-20 ч.

Учет результатов, определяется наличием или отсутствием роста вибрионов в среде, содержащей различные концентрации антибиотика. Последняя пробирка с задержкой роста (прозрачный бульон) соответствует МПК антибиотика в отношении испытуемой культуры вибрионов (табл. 4).

Качество постановки метода периодически контролируется референтными штаммами: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Нормативные документы и рекомендуемая литература

1. Адамов А.К., Наумшина М.С. Холерные вибрионы /Саратов: изд-во ун-та, 1984. – 328 с.
2. Актуальные проблемы холеры / Под ред. В.И. Покровского и Г.Г. Онищенко. – Серия: Вопросы практической эпидемиологии. ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ. – Москва, 2000. – 283 с.
3. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03.
4. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. МУ 3.3.2.2124-06 – М., 2007
5. «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» / Под ред. академика РАМН, профессора Г.Г. Онищенко, чл.-корр. РАМН, профессора В.В. Кутырева. – М. : Медицина, Шико, 2009,– 472 с.
6. Лабораторная диагностика холеры: МУК 4.2.2218-07 – М, 2007
7. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги. – Ростов-на-Дону, 1990. – 159 с.
8. Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» – Москва, 2012.
9. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов / Под ред. В.Н. Милютин. – Ростов-на-

- Дону, 1981. – 175 с.
10. Онищенко Г.Г., Ганин В.С., Голубинский Е.П. Вибрионы не О1 серологической группы и их значение в патологии человека. – М. ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ.– 2001.– 380с.
 11. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности методические указания. МУ 1.3. 2569 -09 – М.,2009
 12. Покровский В.И., Малеев В.В. Холера: Библиотека практического врача. – Л., 1978. – 232 с.
 13. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.2870-11.
 14. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности: СП 1.2.036-95.
 15. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации. Санитарно - эпидемиологические правила.СП.1.1.2521 – 09.- М.,2009.
 16. Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры: МУ 3.1.1.2232-07 – М,2007.
 17. Холера в СССР в период VII пандемии /Под ред. В.И. Покровского. – Москва, «Медицина», 2000. – 471 с.