


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



**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ (БИОЛОГОВ)
И ПРЕПОДАВАТЕЛЕЙ**

ИРКУТСК – 2022

Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт
Сибири и Дальнего Востока»

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

**Учебное пособие
для врачей-бактериологов (биологов)
и преподавателей**

Иркутск – 2022

УДК 616.932-078
ББК 53.4:55.141
P85

Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике холеры: учебное пособие для для врачей-бактериологов (биологов) и преподавателей. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 92 с.

ISBN 978-5-98277-368-5

Утверждено Ученым советом
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора

Учебно-методическое пособие 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 1.5.11 «микробиология», 3.2.2 «эпидемиология»), для практической работы специалистов, занимающихся диагностикой холеры. Издание третье: переработанное и дополненное.

Авторы:

*С.В. Балахонов, Л.В. Миронова, Е.А. Басов, А.С. Пономарева,
Ж.Ю. Хунхеева, И.С. Федотова, А.В. Фортунатова, Т.Ю. Загоскина,
О.В. Гаврилова, Т.М. Долгова, О.Б. Колесникова, О.А. Старикова*

ISBN 978-5-98277-368-5



© Коллектив авторов, 2022
© ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора, 2022
© Оформление ИНЦХТ, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	7
ЗАНЯТИЕ 1	15
ЗАНЯТИЕ 2	16
ЗАНЯТИЕ 3	17
ЗАНЯТИЕ 4	18
ЗАНЯТИЕ 5	19
ЗАНЯТИЕ 6	21
ЗАНЯТИЕ 7	22
ЗАНЯТИЕ 8	23
2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	25
ЗАНЯТИЕ 9	33
ЗАНЯТИЕ 10	35
ЗАНЯТИЕ 11	37
ЗАНЯТИЕ 12	38
ЗАНЯТИЕ 13	40
ЗАНЯТИЕ 14	41
3. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ	42
ЗАНЯТИЕ 15	45
ЗАНЯТИЕ 16	46
4. ПРИЛОЖЕНИЕ	47
4.1. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	47
4.2. РЕАКТИВЫ	52
4.3. КОНСЕРВАНТЫ	52
4.4. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПЛОТНЫХ И ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД	53

4.5. ПРОВЕРКА КАЧЕСТВА ТЕЛЛУРИТА КАЛИЯ (ТК)	54
4.6. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СВОЙСТВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	54
НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ И РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	90

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК	– аминокислота
ВА	– вибриоцидные антитела
ДДМ	– диско-диффузионный метод
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
КА	– контроль антигена
КРЖ	– контроль разводящей жидкости
КС	– контроль сыворотки
КПС	– контроль питательной среды
МПА	– мясопептонный агар
МПБ	– мясопептонный бульон
МПК	– минимальная подавляющая концентрация
МСП	– метод серийных разведений
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
ЩА	– щелочной агар
ЭХЭД	– эритроцитарный холерный энтеротоксический диагностикум
СТ (Cholera Toxin)	– холерный токсин
<i>ctxAB</i>	– гены холерного токсина
MALDI-ToF MS	– времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией
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

Учебно-методическое пособие 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, в т.ч. с использованием методов экспресс- и ускоренной индикации и идентификации (ПЦР, MALDI-ToF масс-спектрометрия, тесты API 20E), 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.

Учебно-методическое пособие разработано в соответствии с программой курсов первичной специализации врачей (биологов) по особо опасным инфекциям (свыше 500 ч), с учетом действующих СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», методических указаний МУК 4.2.3746-22 «Организация и проведение лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного уровня», МУК 4.2.3745-22 «Методы лабораторной диагностики холеры», МУ 3.1.1.2232-07 «Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры» и других законодательных актов и инструктивно-методических документов.

1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Холера – острое инфекционное заболевание из группы особо опасных инфекционных болезней, характеризующееся диарейным синдромом, фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, водным, пищевым и контактно-бытовым путями распространения инфекции.

Возбудителями холеры являются холерные вибрионы O1 серогруппы (биовара классического и биовара Эль Тор) и серогруппы O139.

Холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп, содержащие гены *ctxAB* и *tcpA-F*, вызывают заболевания холерой и являются эпидемически значимыми (токсигенными). Эпидемически незначимые (нетоксигенные) холерные вибрионы не содержат гены *ctxAB* и *tcpA-F*; могут вызывать спорадические (единичные) или групповые (при общем источнике инфицирования) заболевания, не склонные к эпидемическому распространению. Холерные вибрионы, у которых отсутствуют гены *ctxAB*, но имеются *tcpA-F*, относят к нетоксигенным штаммам.

Возбудитель холеры принадлежит к классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Vibrionales*, семейству *Vibrionaceae*, роду *Vibrio*, виду *Vibrio cholerae* (рис. 1).

Холерные вибрионы – граммотрицательные аспорогенные полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки, варьирующие в размерах (1,5–3,0 мкм в длину и 0,2–0,6 мкм в ширину), с одним полярно расположенным жгутиком, который длиннее тела клетки в 2–3 раза и обуславливает выраженную подвижность *V. cholerae*. Являются факультативными анаэробами, хорошо растут на щелочных плотных и жидких питательных средах в присутствии 0,5–2,0%-го раствора хлорида натрия; могут размножаться при 0%-м и 3%-м NaCl. Оптимальные показатели роста: температура 35–37 °C и pH среды 7,6–8,0; могут расти при температуре от 10 °C до 42 °C и pH среды 9,0–9,2.

Холерные вибрионы быстро размножаются, в 1%-й пептонной воде через 6–8 ч образуют на поверхности среды нежную пленку, которая через 24 ч становится более грубой, морщинистой. В мясопептонном бульоне (далее – МПБ) через 3–5 ч наблюдается легкое помутнение среды, через 24 ч – интенсивный рост с образованием рыхлой пленки на поверхности и осадка на дне.

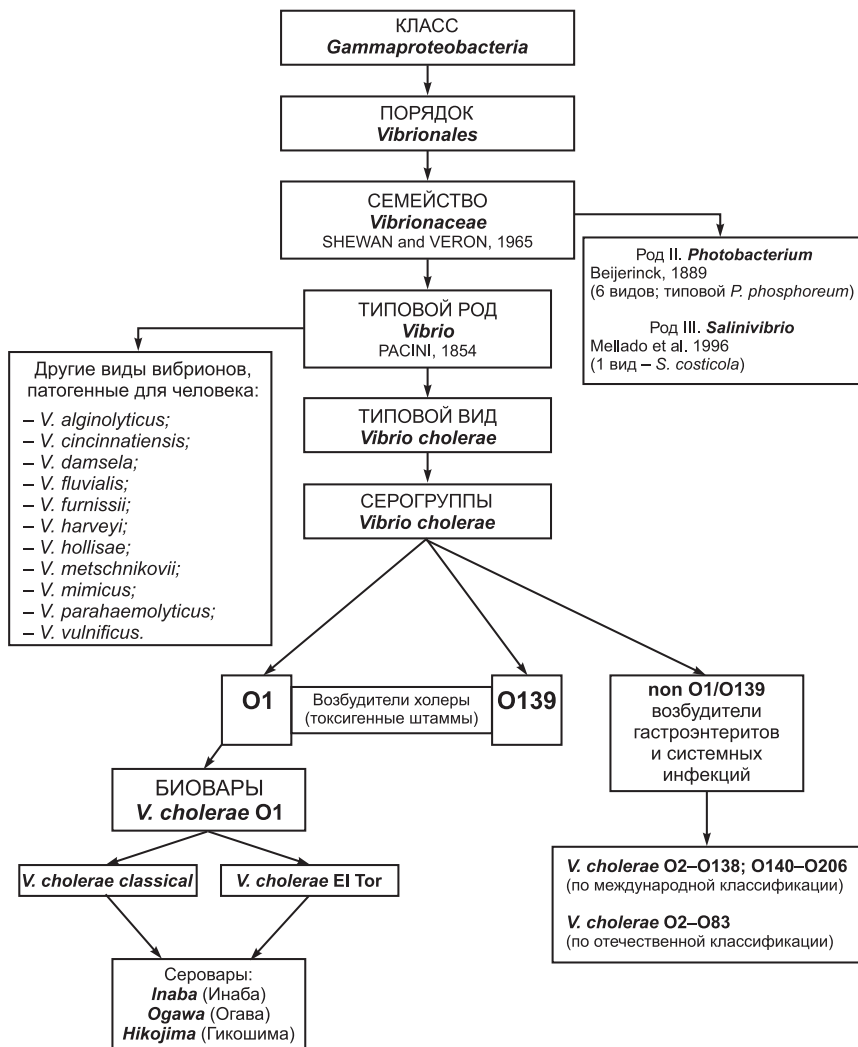


Рис. 1. Таксономия семейства *Vibrionaceae*.

Классификация вибрионов составлена по справочнику Берджи по бактериологической систематике (англ. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed., 2015).

Примечание.

Представители родов *Aeromonas*, *Plesiomonas* и *Enhydrobacter* исключены из семейства *Vibrionaceae*: порядок XII. *Aeromonadales*, семейство I. *Aeromonadoceae*, род I. *Aeromonas* Stanier, 1943 (14 видов); порядок XIII. *Enterobacteriales*, семейство I. *Enterobacteriaceae*, род XXVII. *Plesiomonas* Habs, Schubert. 1962 (1 вид); порядок IX. *Pseudomonadales*, семейство III. *Incertae Sedis*, род I. *Enhydrobacter* Staley, Irgens, Brenner, 1987 (1 вид).

На поверхности плотного питательного агара через 10–12 ч можно видеть образование мелких (до 1 мм в диаметре) гладких (S-форм, англ. smooth), полупрозрачных, голубоватых с ровным краем колоний, которые через 18–24 ч инкубации увеличиваются в размере до 2–3 мм. Могут встречаться атипичные колонии – шероховатые (R-форма, англ. rough) и мукоидного типа (M-форма, англ. mucoid), представляющие собой измененные формы холерного вибриона. Редко встречаются пигментированные колонии (коричневые или светло-желтые).

Холерные вибрионы, как и другие представители рода *Vibrio*, ферментируют до кислоты глюкозу в аэробных и анаэробных условиях, декарбокксилируют лизин и орнитин, не обладают дигидролазой аргинина, 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.

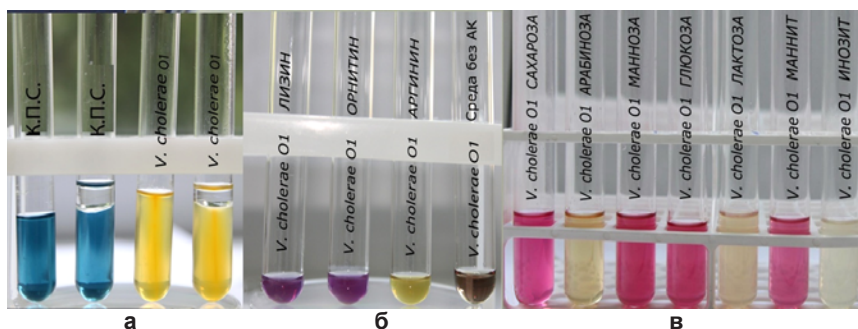


Рис. 2. а – ферментация глюкозы *V. cholerae* в аэробных и анаэробных условиях (среда Хью-Лейфсона); б – ферментация *V. cholerae* аминокислот лизина, орнитина и аргинина на бульоне Мюллера с аминокислотами; в – ферментация сахаров *V. cholerae* на средах Гисса.

V. cholerae по наличию специфического О-антигена распределяются на серологические группы. В настоящее время известно более 200 серологических О-групп холерных вибрионов. Холерные вибрионы О1 серогруппы по различиям в полисахаридном компоненте О-антигена делятся на три серовара: Огава, Инаба и Гикошима. Серовар Гикошима после хранения штаммов в течение нескольких месяцев на искусственных питательных средах может переходить в один из сероваров, в основном Огава, реже Инаба. Описаны штаммы, агглютинирующиеся РО сывороткой и не агглютинирующиеся

сыворотками O1, Огава или Инаба (с полной или частичной утратой способности лизироваться диагностическими холерными бактериофагами).

Холерные вибрионы O1 серогруппы делятся на биовары Эль Тор и классический, имеющих существенные фенотипические и генетические отличия. В связи с высокой устойчивостью выделяемых в последние годы штаммов холерных вибрионов к холерным диагностическим бактериофагам классический и эльтор для определения биоваров патогена используют молекулярно-генетические методы.

Основные признаки, по которым проводится дифференциация вибрионов, приведены в таблице 1.

Геном холерных вибрионов представлен двумя хромосомами размером 2960 т.п.н. и 1070 т.п.н. В составе большой хромосомы локализованы кластеры генов, острова патогенности VPI (англ. *Vibrio pathogenicity island*) и мобильные генетические элементы (МГЭ), включающие детерминанты ключевых и дополнительных факторов, связанных с патогенностью, персистенцией и антибиотикорезистентностью. У большинства штаммов биовара Эль Тор в большую хромосому интегрирован профаг СТХ, несущий гены *ctxAB*, кодирующие биосинтез холерного токсина СТ (англ. *cholera toxin*), отвечающего за развитие основного клинического симптома при холере – диареи, а также дополнительных токсинов Zot, Ace и адгезина Ser. Данный профаг часто тандемно дублирован. Однако встречаются штаммы Эль Тор, имеющие копию СТХ и на малой хромосоме, что обычно характерно для классического биовара. У обоих биоваров на большой хромосоме находится остров VPI-I, содержащий кластер *tcpA-F* (англ. *toxin-coregulated pilus*), ответственный за продукцию токсин-регулируемых пилей адгезии (ТСП) – ключевого фактора колонизации кишечника. Также здесь расположены остров VPI-II с геном нейраминидазы *nanH*, усиливающей действие СТ; кластер RTX, обеспечивающий синтез высокомолекулярного токсина-актиномодулятора MARTX; кластеры биосинтеза антигенов O1 *wbe (rfbO1)* и O139 – *wbf (rfbO139)*, биопленкообразования (*msh, vpsI-rbm-vps2*). Кроме того, на большой хромосоме *V. cholerae* El Тор и O139 присутствует два дополнительных МГЭ – два острова пандемичности, обозначенные как VSP-I (англ. *Vibrio seventh pandemic island*) и VSP-II. Высказано предположение, что эти острова пандемичности обеспечивают высокий уровень адаптации холерных вибрионов к меняющимся условиям окружающей среды.

Таблица 1

Основные дифференциальные признаки рода *Vibrio* и некоторых других микроорганизмов

Признаки	Роды семейства <i>Vibrionaceae</i>				Роды других семейств		
	<i>Vibrio</i>		<i>Salinivibrio</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Enhydrobacter</i>
	<i>V. cholerae</i>	другие виды					
Окраска по Граму, морфология	Грамотрицательные полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки						
Подвижность	+	+ (-)	+	+	+ (-)	+	-
Оксидаза	+	+ (-)	+	+ (-)	+	+	+
Рост на средах без NaCl	+	- (+)	-	-	+	+	+
Чувствительность к 0/129 *	+	+ (-)	X	+	-	+	-
О/Ф глюкозы в среде Хью-Лейфсона	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Газ из глюкозы	-	- (+)	-	+	+ (-)	-	-
Лизин-декарбоксилаза	+	+ (-)	-	+	- (+)	+	+
Орнитин-декарбоксилаза	+	+/-	-	+	- (+)	+	+
Аргинин-дигидролаза	-	- (+)	+	+	+	+	+
Ферментация:							
лактозы	-	- (+)	-	X	- (+)	+	-
маннита	+	+ (-)	+ (-)	-	+ (-)	-	X
арабинозы	-	- (+)	-	-	+ (-)	-	X
сахарозы	+	+ (-)	+	- (+)	+	-	X
инозита	-	- (+)	-	-	-	+	X
Образование:							
ацетилметилкарбинола	+ (-)	- (+)	+	+	+ (-)	-	-
индола	+	+ (-)	-	-	+ (-)	-	-

нитратредуктазы	+	+ (-)	- (+)	+(-)	+	+	+
бета-галактозидазы	+	+ (-)	-	+	+	+	X
желатиназы	+	+ (-)	+	+	+	-	X
Биолюминесценция	- (+)	- (+)	-	+	-	-	X
Мол. % G+C в ДНК	38	51	49,4–50,5	40–44	57–63	51	66

Примечание. * – бактериостатический агент 2,4-диамино-6,7-диизопропилптериоидин; «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.

На малой хромосоме, помимо генов с неустановленной функцией, локализованы структурные гены *hlyA*, детерминирующие синтез термолabileного гемолизина, гены цитотонического токсина *cef*гемагглютинин/протеазы *hapA*, термостабильного токсина *st*, а также SXT-элементы, содержащие гены устойчивости к антимикробным соединениям, и суперинтегрон VCR, способствующий захвату чужеродных генов.

На современном этапе возбудитель холеры характеризуется появлением генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор с мутационными изменениями в гене *ctxB*. На основании выявления нуклеотидных замен в гене *ctxB* возможна дифференциация типичных и генетически измененных штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор (табл. 2). В гене холерного токсина у штаммов Эль Тор, вызывавших эпидемические вспышки, отмечается замена аллели *ctxB3* на аллель *ctxB1* либо *ctxB7* классического биовара. Такие генетически измененные варианты штаммов Эль Тор продуцируют больше холерного токсина, приближаясь по уровню синтеза этого белка к холерным вибрионам классического биовара.

Таблица 2

Сравнительная характеристика аллелей гена *ctxB*, выявляемых у штаммов холерных вибрионов и их продуктов

Аллель гена <i>ctxB</i>	Позиции нуклеотидов в гене			Позиции аминокислотных остатков в белках		
	58	115	203	20	39	68
3	C	T	T	His	Tyr	Ile
1	C	C	C	His	His	Thr
7	A	C	C	Asn	His	Thr

Заносы токсигенных геновариантов биовара Эль Тор с измененными маркерами эпидемической опасности совпадают по времени с их формированием в эндемичных странах (с 1990 г. по настоящее время). Число этих маркеров постепенно возрастает с одного (наличие гена *ctxB1*) до четырех (протяженная делеция в острове VSP-II, наличие аллелей *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101}, *rtxA4/4a*).

Генетические различия между двумя биоварами заключаются в присутствии единичных замен и делений в ряде генов патогенности (*ctxB*, *rstR*, *tcpA*, *hly*), а также в отсутствии некоторых генетических элементов (профага RS1φ, островов пандемичности VSP-I и VSP-II, наличие протяженной делеции в кластере RTX) в штаммах *V. cholerae* биовара классического. В гене *hlyA* холерных вибрионов классического биовара, в отличие от такового *V. cholerae* Эль Тор, имеется делеция протяженностью 11 п.н., вследствие чего продукция гемолизина вибрионами этого биовара невозможна. Данные различия в нуклеотидной последовательности гена *hlyA* могут быть использованы для определения биовара у возбудителя холеры с применением метода амплификации нуклеиновых кислот (далее – ПЦР).

Диапазон изменчивости холерных вибрионов достаточно широк: от морфологии колоний и клеток, образования некультивируемых и L-форм, до ослабления и утраты агглютинабельности диагностическими O1, Инаба и Огава сыворотками и приобретения агглютинабельности только RO сывороткой. Изменчивость может сочетаться по ряду признаков: по культурально-морфологическим признакам, по агглютинабельности холерными сыворотками и по чувствительности к бактериофагам. Нарастание резистентности холерных вибрионов Эль Тор к диагностическому холерному монофагу эльтор значительно затрудняет в настоящее время определение биовара холерных вибрионов O1 серогруппы.

Холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп, как правило, высокочувствительны к большому набору антибактериальных препаратов, в т.ч. к тетрациклам, левомицетину, эритромицину, нитрофуранам, цефалоспорином. Широкое применение антибактериальных препаратов в очагах холеры способствовало увеличению резистентности холерных вибрионов к антибиотикам. В последние три десятилетия неоднократно были зарегистрированы вспышки холеры, вызванные полиантибиотикорезистентными вариантами возбудителя, что обуславливает определенные трудности в проведении этиотропного лечения холеры и профилактики этого заболевания.

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 препаратам, 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 (табл. 3).

Таблица 3

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	≥ 19	≤ 17	≤ 2,0	≥ 4,0
Тетрациклин	30	≥ 19	≤ 17	≤ 4,0	≥ 8,0
Левомецетин	30	≥ 23	≤ 19	≤ 4,0	≥ 16,0
Налидиксовая кислота	30	≥ 20	≤ 18	≤ 4,0	≥ 16,0
Ципрофлоксацин	5	≥ 25	≤ 19	≤ 0,1	≥ 1,0
Офлоксацин	5	≥ 25	≤ 15	≤ 0,1	≥ 1,0
Пефлоксацин	10	≥ 22	≤ 16	≤ 0,1	≥ 1,0
Норфлоксацин	10	≥ 22	≤ 19	≤ 0,1	≥ 1,0
Ломефлоксацин	10	≥ 22	≤ 19	≤ 0,1	≥ 1,0
Левифлоксацин	5	≥ 22	≤ 19	≤ 0,1	≥ 1,0
Рифампицин	5	≥ 20	≤ 13	≤ 4,0	≥ 16,0
Стрептомицин	30	≥ 15	≤ 12	≤ 16,0	≥ 32,0
Гентамицин	10	≥ 16	≤ 12	≤ 4,0	≥ 8,0
Канамицин	30	≥ 17	≤ 15	≤ 16,0	≥ 32,0
Амикацин	30	≥ 17	< 15	≤ 8,0	≥ 16,0
Тобрамицин	10	≥ 17	< 12	≤ 4,0	≥ 16,0
Нетилмицин	30	≥ 19	< 17	≤ 4,0	≥ 8,0
Ампициллин	10	≥ 17	≤ 13	≤ 4,0	≥ 16,0
Цефотаксим	30	≥ 25	< 15	≤ 1,0	≥ 4,0
Цефтриаксон	30	≥ 25	< 15	≤ 1,0	≥ 4,0
Фуразолидон	300	≥ 18	< 15	≤ 4,0	≥ 16,0
Триметоприм/ сульфаметоксазол	1,25/ 23,75	≥ 20	< 15	≤ 2,0/38,0	≥ 8,0/152,0

Примечание. S* – чувствительный; R* – устойчивый.

ЗАНЯТИЕ 1

1.1. Изучение культурально-морфологических и биохимических свойств *V. cholerae* classical, *V. cholerae* El Tor и *V. cholerae* O139

1.1.1. Приготовление мазков и окраска их по Граму.

1.1.2. Посев агаровых культур секторами на одну чашку ЩА (МПА), селективные среды (TCBS и др.), пробирки со скошенным ЩА (МПА), лактозо-сахарозной средой, 1%-й ПВ, 0,3%-м полужидким агаром (ПЖА), средами Гисса с сахарозой, маннозой, арабинозой, крахмальной средой с индикатором Андреде и желатиной.

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

1.1.4. Посев смеси культур холерного вибриона и кишечной палочки секторами на ЩА (МПА) и селективные среды.

Примечание:

- все посевы помещают в термостат при 37 °С, желатину – при комнатной температуре.

Материал и оборудование*

18-часовая агаровая культура <i>V. cholerae</i> classical на скошенном ЩА (МПА)	1 пробирка
18-часовая агаровая культура <i>V. cholerae</i> El Tor на скошенном ЩА (МПА)	1 пробирка
18-часовая агаровая культура <i>V. cholerae</i> O139 на скошенном ЩА (МПА)	1 пробирка
Суспензия клеток <i>V. cholerae</i> El Tor и <i>E. coli</i> в физиологическом растворе	1 пробирка
ЩА (МПА), pH 7,8–8,0 скошенный	3 пробирки
ЩА (МПА), pH 7,8–8,0	4 чашки
Среда TCBS	4 чашки
1%-я ПВ	3 пробирки
0,3%-й 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 °С	
Предметное стекло	
Покровное стекло	

Примечание. * – здесь и далее рассчитано на одного курсанта.

ЗАНЯТИЕ 2

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

2.1.1. Изучение характера роста культур на 1%-й ПВ.

2.1.2. Изучение морфологии колоний на ЩА (МПА) и селективных средах.

2.1.3. Сравнение характера роста холерных вибрионов и кишечной палочки на ЩА (МПА) и селективных средах.

2.1.4. Изучение подвижности вибрионов в 0,3%-м ПЖА.

2.1.5. Определение у культур результатов ферментации углеводов и многоатомных спиртов (приложение 4.6.1).

2.1.6. Определение характера изменения лактозо-сахарозной среды.

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

2.1.8. Проведение предварительного учета протеолитической активности (приложение 4.6.1).

2.2. Определение принадлежности культуры к роду *Vibrio*

2.2.1. Приготовление препарата с культурой на предметном стекле.

Окраска препарата по Граму.

2.2.2. Определение подвижности культуры в раздавленной капле.

2.2.3. Определение у культуры наличия индофенолоксидазы (приложение 4.6.1).

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

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

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

Материал и оборудование

ЩА (МПА), pH 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 орнитинном	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской без аминокислоты (контроль)	1 пробирка
Предметное стекло	1 шт.
Покровное стекло	1 шт.
Масло вазелиновое стерильное	5–7 мл
Микроскоп с фазово-контрастным устройством	1 шт.
Реактивы для окраски по Граму	1 шт.
Реактив на оксидазу	0,5 мл
Термостат	

ЗАНЯТИЕ 3

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

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

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

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

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

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

3.2.4. Посев культуры на среду Кларка (приложение 4.6.4).

3.2.5. Посейте агаровую культуру *V. cholerae* El Tor в 4–5 мл МПБ (для постановки пробы Грейга) и на скошенный ЩА (МПА).

Примечание:

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

Материал и оборудование

МПБ pH 7,6–7,8 5–8 мл	3 пробирки
0,7%-й ПЖА pH 7,6–7,8	2 пробирки
ЩА (МПА) pH 7,8–8,0	2 чашки
ЩА (МПА), pH 7,8–8,0 скошенный	1 пробирка

Среда Кларка по 1 мл	2 пробирки
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
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	1 шт.
Термостат	1 шт.
Микроскоп с фазово-контрастным устройством	1 шт.

ЗАНЯТИЕ 4

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

4.1.1. Учет РА. Определение серогруппы и сероварианта холерного вибриона.

4.2. Дифференция биоваров *V. cholerae* classical и *V. cholerae* El Tor (приложение 4.6.3)

4.2.1. Учет реакции Фогес-Проскауэра.

4.2.2. Постановка ПЦР (для дифференциации биоваров холерных вибрионов).

Материал и оборудование

6%-й альфа-нафтол	3 мл
40%-й КОН	1 мл
Пипетка пастеровская	2 шт.
Пипетка на 1 мл	5 шт.
Пробирка бактериологическая	2 шт.

Водяная баня	
Термостат	
Холодильник	

ЗАНЯТИЕ 5

5.1. Изучение чувствительности *V. cholerae* El Tor к антибиотикам

Посев культуры на МПБ для определения чувствительности к антибиотикам.

5.2. Изучение эпидемической значимости *V. cholerae* El Tor

Постановка ПЦР (для определения эпидемической значимости холерных вибрионов).

Постановка пробы Грейга (приложение 4.6.6) при невозможности поставить ПЦР

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

5.2.1.1. Постановка ПЦР для выявления в исследуемом материале фрагмента гена *ctxA* *V. cholerae* (приложение 4.6.6).

Материал 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	10 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.
Штатив «рабочее место» для пробирок 200 мкл	1 шт.
Дозатор автоматический одноканальный с переменным объемом 0,5–10 мкл	
Дозатор автоматический одноканальный с переменным объемом 50–200 мкл	

Амплификатор ДНК с нагреваемой крышкой
Весы лабораторные электронные
Источник питания для электрофореза в агарозном геле
Камера для горизонтального электрофореза
УФ трансиллюминатор

5.2.2. Идентификация токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 классического и эльтор биоваров, дифференциация эльтор вибрионов на типичные и измененные методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов.

5.2.2.1. Постановка ПЦР для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 классического биовара (по наличию генов: *rfb01* – кодирует биосинтез O1-антигена; *cas3*-хеликазы CRISPR/CAS-системы; *ctxB^{Class}* – аллель гена *ctxB* классического типа), эльтор биовара (по наличию генов: *fb01*; *rtxC* – кластер *rtx* генов, кодирующих биосинтез RTX-токсина; *ctxB^{Eltor}* – аллель гена *ctxB* эльтор типа) и измененных вариантов эльтор вибрионов (по наличию генов: *fb01*, *rtxC*, *ctxB^{Class}*).

Материал и оборудование

ДНК штамма холерного вибриона	20 мкл
Набор реагентов Ген <i>Vibrio cholerae</i> вариант <i>ctxB</i> -РЭФ	На 3 реакции
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 с нагреваемой крышкой	1 шт.
Весы лабораторные электронные	1 шт.
Источник питания для электрофореза в агарозном геле	1 шт.
Камера для горизонтального электрофореза	
УФ трансиллюминатор	
Пробирка 0,2 мл	8 шт.
Одноразовые наконечники 0,5–10 мкл	14 шт.
Одноразовые наконечники до 200 мкл	6 шт.
Агароза	1,5 г
1 х трис-боратный электрофорезный буфер	1,5 л
Раствор бромистого этидия	10 мкл

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

5.2.3.1. Проведение идентификации и оценка эпидемической значимости по комплексу генов *ctxA*, *tcpA*, *wbeT*, *hlyA*, *wbfR* в ПЦР с учетом результатов в режиме «реального времени» (приложение 4.6.6).

Материал 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 гибридационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс <i>Vibrio cholerae</i> -FL»), в т. ч.	
пробирка ПЦР-смесь-1-FRT <i>V. cholerae</i> «Скрин»	4 шт.
пробирка ПЦР-смесь-1-FRT <i>V. cholerae</i> «Тип»	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 с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q)	

ЗАНЯТИЕ 6

6.1. Изучение эпидемической значимости *V. cholerae* El Tor (продолжение)

6.1.1. Учет результатов пробы Грейга (при невозможности поставить ПЦР).

6.2. Изучение чувствительности *V. cholerae* El Tor к антибиотикам (приложение 4.6.7).

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

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

Материал 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* El Tor к антибиотикам (продолжение)

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

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

Оценка результатов по таблице 3.

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

7.2.1. Изучение морфологии колоний на ЩА (МПА) *V. cholerae* неO1/неO139, *Aeromonas*, *Plesiomonas*.

7.2.2. Изучение морфологии микробных клеток в мазках, окрашенных по Граму.

7.2.3. Приготовление препарата «раздавленная капля» из агаровой культуры.

7.2.4. Определение оксидазной активности.

7.2.5. Посев культуры на среды: Хью-Лейфсона,

- Гисса с маннитом, инозитом, сахарозой, маннозой, арабинозой,
- Биргер-Крушинской с лизином, орнитином и аргинином.

Материал и оборудование

18-часовая культура <i>V. cholerae</i> не O1/O139 на пластинке МПА	1 чашка
18-часовая культура <i>Aeromonas</i> на пластинке ЩА (МПА)	1 чашка
18-часовая культура <i>Plesiomonas</i> на пластинке ЩА (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 орнитинем	.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)

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

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

8.1.3. Оценка декарбоксилазной и дигидролазной активности в средах Биргер-Крушинской.

Сравнение полученных результатов с таблицей 1.

8.2. Определение видовой принадлежности исследуемой культуры на основании ускоренных и микрообъемных методов.

8.2.1. Отработка методологии времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (Maldi-ToF MS) для идентификации:

8.2.1.1. Подготовка материала для масс-спектрометрического анализа посредством прямого нанесения культуры на MSP-чип (приложение 4.6.8).

8.2.1.2. Экстракция белков с использованием этанола, муравьиной кислоты и ацетонитрила (приложение 4.6.8). Масс-спектрометрический анализ (приложение 4.6.8).

8.2.2. Биохимическая идентификация исследуемой культуры с использованием тест-системы «Bio Merieux» (Франция).

8.2.2.1. Определение у культуры биохимической активности по 20 тестам (приложение 4.6.9).

Материал и оборудование

18-часовая культура <i>V. cholerae</i> не O1/O139 на пластинке ЩА (МПА)	1 чашка
Суспензия клеток <i>V. cholerae</i> El Tor и <i>E. coli</i> в физиологическом растворе по стандарту Мак-Фарланда	1 пробирка
18-часовая культура <i>Aeromonas</i> на пластинке ЩА (МПА)	1 чашка
Ацетонитрил, 99,8%-й	100 мкл
Вода деионизованная ультрачистая	600 мкл
Муравьиная кислота, $\geq 95\%$ 100 мкл	100 мкл
Калибровочный стандарт для MicroFlex масс-спектрометра	1 мкл
Спирт этиловый, 96%-й (ГОСТ Р 51652-2000)	1800 мкл
Матрица (α -Циано-4-гидроксикоричная кислота)	3 мкл
Тесты API 20E «Bio Merieux» (Франция)	1 шт.
Пробирки микроцентрифужные Safe-Lock Tubes, 1,5 мл	2 шт.
Наконечники для механического дозатора, 0,1–10 мкл	10 шт.
Наконечники для механического дозатора, 10–100 мкл	10 шт.
Наконечники для механического дозатора, 100–1000 мкл	10 шт.
Петля бактериологическая, стерильная, 1 мкл	4 шт.
Емкость-контейнер полимерный для дезинфекции	1 шт.
Штатив для микроцентрифужных пробирок Safe-Lock Tubes, 1–5 мл	1 шт.
MALDI-TOF масс-спектрометр MicroFlex (Bruker Daltonik GmbH) или иного производителя с возможностью идентификации ООИ	1 шт.
MSP-мишень (Чип) для нанесения образцов, 96-луночная	1 шт.
Лабораторная настольная центрифуга с ротором для микропробирок объемом 1,5 мл до 13000 об/мин	
Микроцентрифуга-встряхиватель	
Дозатор механический одноканальный 0,5–10 мкл	
Дозатор механический одноканальный 10–100 мкл	
Дозатор механический одноканальный 100–1000 мкл	
Термостат на 37 °C	

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 4.2.3745-22 «Методы лабораторной диагностики холеры» и МУК 4.2.3746-22 «Организация и проведение лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного уровня».

Алгоритм лабораторной диагностики *V. cholerae* (рис. 3) основан на поэтапном использовании жидкой накопительной среды (1%-я ПВ, 1%-я ПВ с теллуридом калия) с последующим высевом из нее на плотные щелочные агары (ЩА, мясо-пептонный, Мартена, Хоттингера) и селективные дифференциально-диагностические среды (ТСБС 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 косопрходящем свете с голубым или зеленоватым оттенком.

Колонии холерных вибрионов на селективных средах ТСБС 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 °С в 1%-й ПВ в течение 6–8 ч, 1%-й ПВ с теллуридом калия – 12–18 ч, на щелочном агаре – 14–16 ч, плотных селективных средах – 18–24 ч.

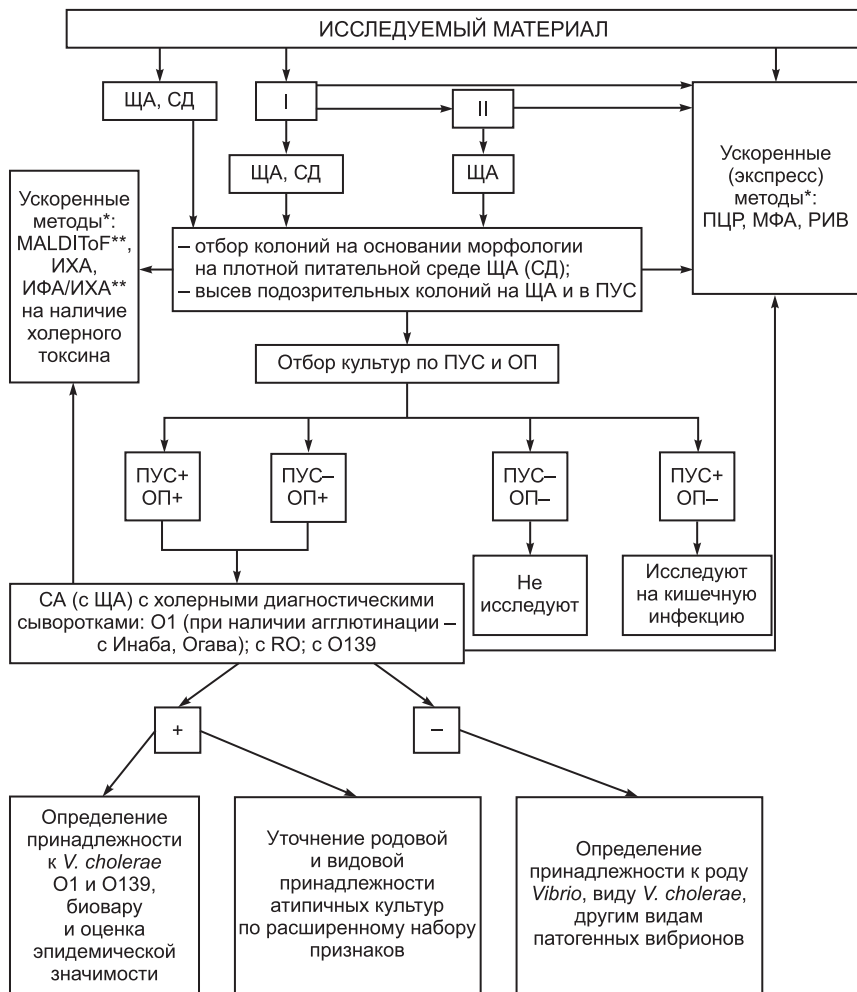


Рис. 3. Схема лабораторного исследования на холеру.

Примечание.

I и II – среды накопления; ЩА – щелочной агар; СД – селективнодифференциальная среда; * – методы ускоренной (экспресс) диагностики (ПЦР, МФА, РИВ) могут быть использованы на всех этапах исследования; ** – при наличии.

Бактериологическое исследование на холеру материала от больных, лиц, обследуемых на вибрионоительство, 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, исследуемый материал в количестве 0,5–1 мл засеивается пипеткой в 50–100 мл 1%-й 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%-й пептонной воды с теллуридом калия.

При появлении первых случаев подозрения на заболевание холерой в обязательном порядке необходимо использовать методы экспресс и ускоренной диагностики (ПЦР, МФА, РИВ и др.) на первом, втором и последующих этапах исследования.

При выявлении маркеров возбудителя холеры, положительных результатах, полученных при использовании ускоренных методов (не менее двух), может быть выдан предварительный положительный ответ.

Материал от подозрительных на вибрионоительство 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 вибрионоительство.

Материал, доставленный в 5 мл 1%-й пептонной воды, полностью используется для посева в 50 мл среды накопления. В случае поступления в лабораторию материала, забранного в 50 мл 1%-й 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%-й 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%-й пептонной воды (предпочтительно в широкодонные колбы) и на 2 чашки щелочного агара так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Посевы инкубируются при 37 °С 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.

На II этапе (через 6–8 ч от начала исследования) с поверхности I-й среды накопления производится пересев на пластинку щелочного агара, на одну из селективных сред, и в 5–8 мл 1%-й ПВ (II-я среда нако-

пления). Пересевы в жидкие и на плотные среды делают с поверхности жидкой среды бактериологической петлей диаметром 5 мм.

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. Отбор подозрительных на холерный вибрион колоний в посевах нативного материала на ЩА можно начинать уже на III этапе, используя стереоскопический микроскоп с косым освещением. При отборе колоний обращают внимание на типичные и на атипичные колонии.

IV этап (через 18–24 ч от начала исследования). Отбор подозрительных на холерный вибрион колоний в посевах нативного материала на плотные среды, а также в посевах из первой и второй накопительных сред.

Чашки с посевами просматривают в проходящем свете невооруженным глазом или с помощью лупы, а также (особенно в вечернее и ночное время) под стереоскопическим микроскопом в косо проходящем свете и отбирают подозрительные на вибрионы колонии для выделения и идентификации культуры.

На чашках со ЩА колонии холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в типичной S-форме — круглые, гладкие, плоские, голубоватые, гомогенные, с ровными краями, прозрачные в проходящем свете и светло-серые с голубым или зеленоватым оттенком под стереоскопическим микроскопом в косо проходящем свете.

Колонии холерных вибрионов на селективно-дифференциальной питательной среде TCBS (англ. Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar) имеют ярко-желтую окраску на зеленом фоне среды, полупрозрачные до 1,0 мм в диаметре. Размеры колоний на ЩА через 10–12 часов инкубации обычно не превышают 1 мм, а к 18–24 ч достигают 2–3 мм в диаметре. Темпы формирования колоний холерных вибрионов на элективных средах несколько замедлены, поэтому просмотр посевов следует проводить не ранее чем через 18–20 часов инкубации, когда размеры их становятся близки к колониям, растущим на ЩА.

В отдельных случаях в посевах могут встречаться атипичные колонии: мутные с плотным центром, пигментированные (коричневые или светло-желтые), мельчайшие коккоподобные, шероховатые, слизистые. В таких случаях следует провести пересев на обычную питательную среду без элективных добавок (агар Мартена, агар Хоттингера, МПА) для получения колоний в S-форме.

При определении индофенолоксидазы на этапе отбора подозрительных колоний используют или индивидуальный тест для обнаружения бактериальной цитохромоксидазы, или однокомпонентный реактив

(без альфа-нафтола). С подозрительными колониями, выросшими на селективно-дифференциальных средах, пробу на оксидазу ставить не рекомендуется.

При наличии в лаборатории масс-спектрометра изолированные колонии идентифицируются до вида с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным разделением масс-спектрометрии MALDI-ToF MS (англ. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry) (далее – MALDI-ToF масс-спектрометрия).

Подозрительные оксидазопозитивные колонии проверяют в слайд-агглютинации (СА) с сывороткой диагностической холерной O1 в разведении 1 : 50–1 : 100. При положительной реакции с сывороткой холерной O1 и достаточном количестве подозрительных колоний ставят СА с вариантоспецифическими сыворотками Инаба и Огава в разведении 1 : 50–1 : 100, готовят мазки для окраски по Граму. При отрицательных результатах колонии проверяют в СА с холерными сыворотками O139 и RO. В СА допускается использовать зарегистрированные в установленном порядке препараты диагностических агглютинирующих моноклональных антител (далее – МКА) в соответствии с инструкциями к ним.

На этом этапе материал из колоний может быть также использован для проведения ПЦР и масс-спектрометрии.

Положительные результаты в СА с сывороткой диагностической холерной O1 в разведении 1 : 100 и вариантоспецифической в разведении 1 : 50 и (или) с диагностическими агглютинирующими препаратами МКА в рабочем разведении, наличие индофенолоксидазы в сочетании с морфологическими, культуральными признаками, а также положительные результаты ПЦР позволяют выдать на данном этапе предварительный положительный ответ об обнаружении в исследуемом материале культуры холерного вибриона O1 соответствующего серовара, биовара и эпидемической опасности (по результату ПЦР). В случае положительной реакции с сывороткой диагностической O139 на данном этапе выдается предварительный положительный ответ об обнаружении в исследуемом материале культуры холерного вибриона O139 серогруппы.

Подозрительные на вибрионы колонии (агглютинирующиеся и не агглютинирующиеся сыворотками диагностическими холерными O1 и O139) высевают в одну из полиуглеводных сред (далее – ПУС) – лактозо-сахарозную, Ресселя, Клиглера, маннозо-сахарозную или другие – и на сектор ЩА с целью накопления культуры для дальнейшей идентификации и определения чувствительности к антибиотикам. Отсев на ПУС и ЩА следует проводить из одной и той же колонии.

V этап (через 24–36 ч от начала исследования).

При просмотре ПУС отбирают культуры с типичным для вибрионов характером изменений:

- в двууглеводных средах (лактозо-сахарозная, глюкозо-лактозная и Клиглера) наблюдается характерное для кислой реакции изменение цвета столбика без образования газа при сохранении цвета скошенной части. На среде Клиглера возможно определение активности как тиосульфатредуктазы (образование сероводорода за счет расщепления входящих в состав среды сульфата закисного железа, тиосульфата натрия и сульфата натрия), так и определение активности цистиндесульфогидролазы (образование сероводорода за счет расщепления L-цистеина в мясопептонном агаре, составляющем основу данной среды). Холерные вибрионы в большинстве случаев не продуцируют фермент тиосульфатредуктазу и продуцируют цистиндесульфогидролазу. Поэтому образование сероводорода или его отсутствие на среде Клиглера не является определяющим признаком при отборе колоний, подозрительных на колонии холерного вибриона;

- в маннозо-сахарозной среде за счет ферментации обоих углеводов окрашиваются и столбик, и скошенная часть (без образования газа).

С культурами, отобранными как подозрительные на холерные вибрионы, выполняют следующие тесты:

- проверяют чистоту культуры и определяют морфологию клеток в мазке, окрашенном по Граму;

- определяют наличие индофенолоксидазы;

- проверяют агглютинабельность в СА с холерными диагностическими сыворотками O1 в разведении 1 : 100; RO, Инаба и Огава – в разведении 1 : 50, или при отрицательных результатах с этими сыворотками ставят СА с холерной сывороткой O139 серогруппы.

На основании положительных результатов агглютинации оксидазопозитивных культур с сыворотками холерными O1, Инаба и (или) Огава выдают предварительный положительный ответ о выделении из исследуемого материала культуры холерного вибриона O1 соответствующего серовара.

Если выделенная оксидазопозитивная культура агглютинируется холерной сывороткой O139 при отрицательных результатах с диагностической сывороткой холерной O1 серогруппы, выдают предварительный ответ о выделении холерного вибриона O139 серогруппы.

Дальнейшая идентификация заключается:

- в определении систематического положения (рода *Vibrio* вида *cholerae*) по биохимической активности с использованием микробъемных тест-систем или других методов;

- в подтверждении наличия O1 антигена и серовара в объемной реакции агглютинации с холерными диагностическими сыворотками O1, Огава, Инаба, RO или O139 в СА;
- в определении биовара (классического или Эль Тор), типичного или генетически измененного биовара Эль Тор методом ПЦР;
- в определении эпидемической значимости и биовара методом ПЦР (при невозможности проведения ПЦР-анализа, определяют гемолитическую активность по Грейгу);
- определяют чувствительность и (или) резистентность к антимикробным препаратам.

Культуры, выделенные от больных и не агглютинирующиеся холерными диагностическими сыворотками, идентифицируют до вида и определяют антибиотикограмму.

VI этап (через 36–48 ч от начала исследования).

На этом этапе проводят учет результатов идентификации культур: антигенной структуры (объемная агглютинация), родовой и видовой принадлежности (биохимическая активность), биовара и эпидемической значимости (ПЦР) (в качестве дополнительного – учет пробы Грейга), антибиотикограммы. По полученным результатам выдают окончательный ответ о выделении культуры *V. cholerae* соответствующей серогруппы, серовара и биовара с указанием типичности или генетической измененности биовара Эль Тор.

При выделении от больного или вибриононосителя культуры холерного вибриона, не агглютинирующейся холерными сыворотками O1 и O139, выдают ответ о выделении холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп.

Исходные чашки с плотными питательными средами, с которых были отобраны подозрительные на холерный вибрион колонии, оставляют до завершения исследования.

При наличии агглютинирующих диагностических сывороток определяют принадлежность указанных вибрионов к другим серогруппам (O2–O83).

Исследование проб объектов окружающей среды

Схема анализа объектов окружающей среды отличается от схемы исследования материала от больных только на I этапе, II–VI этапы аналогичны и изложены выше.

Вода поверхностных водоемов и вода питьевая.

С целью первичного накопления вибрионов в зависимости от времени доставки пробы возможны следующие варианты посевов.

В исследуемую пробу воды добавляют раствор основного пептона до 1%-й концентрации, определяют pH, в случае необходимости подщелачивают 10%-м раствором NaOH до pH $8,4 \pm 0,1$. Время инкубации

в первой среде накопления 8–10 часов. Объем второй среды накопления – 10 мл. Время инкубации в среде без теллурита калия 6 часов, с теллуритом калия 18–20 часов.

В исследуемую пробу воды добавляют раствор основного пептона до 1%-й концентрации и прошедший контроль теллурит калия в конечном разведении из рабочего разведения 1 : 4000, при котором достигается ингибирование роста сопутствующей микрофлоры и рост холерного вибриона. Устанавливают рН $8,4 \pm 0,2$, время инкубации 18–24 ч. Вторая среда накопления – 10 мл без теллурита калия, время инкубации 6–8 ч.

При интенсивном бактериальном загрязнении проб можно использовать III среду накопления.

Исследуемую пробу воды фильтруют через стерильные мембранные фильтры № 2 или 3, смыв с фильтров вносят в среду накопления и засевают на агаровые пластинки. В случае необходимости проведения индикации из смывной жидкости делают мазки для окраски флуоресцирующими холерными иммуноглобулинами и ставят ПЦР.

Хозяйственно-бытовые сточные воды.

Сточные воды, доставленные в объеме 1 л, фильтруют через стерильный бумажный или матерчатый фильтр для освобождения от механических примесей (при необходимости).

После добавления к пробам основного раствора пептона до 1%-й концентрации устанавливают рН $8,4 \pm 0,2$ и инкубируют в объемах по 500 мл в течение 2–10 ч (первая среда накопления). При добавлении теллурита калия 1 : 100000 (1 : 200000) инкубация длится 12–24 ч.

При отборе проб сточных вод марлевыми тампонами последние помещают в широкогорлые колбы или банки с 500 мл накопительной среды и далее исследуют, как указано выше.

Гидробионты.

Лягушку непосредственно перед исследованием обездвигивают уколом иглы в спинной мозг и фиксируют на препаровальной доске брюшком вверх. Поверхность брюшка обрабатывают спиртом и ножницами делают медиальный разрез.

Желчный пузырь отсекают от печени, разрезают и делают отпечаток на чашке со ЩА. Остатки желчи вместе с желчным пузырем помещают во флаконы с 50–100 мл 1%-й пептонной воды.

Содержимое желудка засевают в 50–100 мл 1%-й пептонной воды, а внутренней поверхностью стенки делают отпечатки на ЩА.

Посев кишечника проводят аналогичным образом, отсекая несколько петель в верхнем, среднем и нижнем отделах кишечника.

У крупных рыб в том же порядке засевают в накопительную среду содержимое желчного пузыря, желудка, кишечника и жабры. Мелких рыб

(мальков) измельчают ножницами по 10–20 экземпляров в одной пробе, суспензируют (или гомогенизируют) и делают посев суспензии петлей на чашку с питательным агаром в 50–100 мл 1%-й пептонной воды.

Дафний, циклопов и других рачков, так же как и фитопланктон, растирают в ступке и засевают петлей в 50 мл 1%-й пептонной воды.

У раков исследуют кишечник, фрагменты хитинового панциря и жабры, делая посев содержимого в среду накопления (50 мл) и отпечаток слизистой стенки кишечника на агаровую среду.

Пищевые продукты.

Безалкогольные напитки исследуют тем же методом, что и воду.

Молоко в количестве 5 мл засевают в 50–100 мл среды накопления или к 0,5 л молока добавляют основной раствор пептона до 1%-й концентрации его в молоке. Другие молочные продукты (кефир, сметану, творог, мороженое и т. д.) в количестве 5–10 мл засевают в 1%-ю пептонную воду.

Навеску пробы твердых пищевых продуктов (25 г) измельчают в гомогенизаторе или растирают в стерильной ступке, а затем переносят в 125 мл среды накопления и засевают петлей на агаровые среды.

Масло животное засевают в среду накопления в количестве 5–10 г, предварительно размягчив его в термостате или делают посев смыва с поверхности его кусков.

После посева продукта устанавливают рН среды ($8,4 \pm 0,2$).

Смывы с объектов окружающей среды и мух высевают в 5–10 мл 1%-й пептонной воды и исследуют по обычной схеме.

ЗАНЯТИЕ 9

9.1. Исследование испражнений больного.

I этап (начало исследования)

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

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

9.1.3. Посев бактериологической петлей нативного материала на чашку ЩА (МПА) и чашку селективной среды.

9.1.4. Использование ускоренных методов исследования нативного материала:

- МФА (приложение 4.6.2.);
- РИВ (приложение 4.6.2.);
- РНГА с использованием холерного иммуноглобулинового антигена (приложение 4.6.2.).

По результатам исследования ускоренными методами выдача предварительного ответа.

II этап (через 6 ч от начала исследования).

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

9.2.2. Высев стандартной петлей с поверхности I среды накопления на пластинки ЩА (МПА) и селективной среды.

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

III этап (через 12 ч от начала исследования).

9.3.1. Высев со II среды накопления на пластинку ЩА (МПА).

9.3.2. Просмотр в проходящем свете невооруженным глазом или под стереоскопическим микроскопом с косым освещением посевов нативного материала и отбор подозрительных на рост вибриона колоний.

9.3.3. 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.).

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

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

9.3.6. 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</i> classical или <i>V. cholerae</i> El Tor	1	пробирка
МПБ рН 7,6–7,8	3	пробирки
1%-я ПВ рН 8,2–8,4 50 мл	1	флакон
1%-я ПВ рН 8,2–8,4 5–8 мл	1	пробирка
ЩА (МПА) рН 7,8–8,0	3	чашки

ЩА (МПА) рН 7,8–8,0 скошенный	3 пробирки
Лактозо-сахарозная среда	3 пробирки
Холерные агглютинирующие сыворотки:	
О1 1 : 50 и 1 : 100	0,5 мл
О139 в рабочем разведении	0,5 мл
Люминесцирующая холерная сыворотка (в рабочем разведении)	0,5 мл
Чашки Петри для слайд-агглютинации	1 шт.
Эритроцитарный холерный антителы диагностикум	0,5 мл
Пробирка бактериологическая стерильная	2 шт.
Пипетка на 1 мл	3 шт.
Автоматический дозатор	1 шт.
Термостат	
Микроскоп с фазово-контрастным устройством	1 шт.
Микроскоп стереоскопический с косым освещением	1 шт.

ЗАНЯТИЕ 10

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

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

10.1.2. 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).

10.1.3. Подтверждение принадлежности культуры к виду *Vibrio cholerae*, биоварам *V. cholerae* classical и *V. cholerae* El Tor по полной схеме:

- постановка развернутой реакции агглютинации с холерными сыворотками О1, RО, Инаба, Огава;
- определение ферментации сахарозы, маннозы, арабинозы (приложение 4.6.1);
- отсев культуры на косячок МПА и 0,3%-й ПЖА (для хранения);
- отсев культуры на среду Кларка для постановки реакции Фогес-Проскауэра (приложение 4.6.4).

10.1.4. Определение эпидзначимости культуры комплексным методом (приложение 4.6.6):

- отсев культуры для постановки пробы Грейга в МПБ.

10.1.5. Изучение чувствительности культуры к антибиотикам методом серийных разведений в жидкой питательной среде (приложение 4.6.7).

10.1.6. 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 реакции РИВ (приложение 4.6.2).

При наличии в лаборатории сывороток 02–083 серогрупп и фагов ТЭПВ определение сероварианта и фаговара выделенной культуры в соответствующих пробах и реакциях.

10.2. Исследование воды.

I этап (начало исследования)

10.2.1. Анализ пробы воды проводится в двух объемах по 450 мл. К 450 мл исследуемой воды добавление 50 мл основного раствора пептона (до 1%-й концентрации) и 11,1 мл или 5,6 мл 0,05%-го рабочего разведения теллурита калия (до концентрации 1 : 100000 и 1 : 200000 соответственно).

Определение рН. При необходимости подщелачивание 10%-м раствором едкого натрия до рН $8,4 \pm 0,1$. Инкубация при 37 °С в течение 14–18 ч.

Материал и оборудование

Каждому курсанту выдают для исследования 900 мл воды, искусственно инфицированных <i>V. cholerae</i> не О1	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
ЩА (МПА) рН 7,6–7,8	3 чашки
ЩА (МПА) рН 7,6–7,8 скошенный	1 пробирка
0,7%-й ПЖА рН 7,6–7,8	3 пробирки
0,3%-й 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%-й) рН 8,2–8,4 по 50 мл	2 флакона
0,05%-й раствор теллурита калия	25 мл
Масло вазелиновое стерильное	5 мл
Сыворотка агглютинирующая холерная О1 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%-й 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 рН)	1 шт.
Термостат	

ЗАНЯТИЕ 11

11.1. Исследование испражнений больного (окончание).

V, VI, VII этапы

11.1.1. Постановка реакции Фогес–Проскауэра.

11.1.2. 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 агглютинирующей холерными O1 и O139 сыворотками, но относящейся к роду *Vibrio*, принадлежащей к O2–O83 сероварам, лизирующей фагами ТЭПВ, выдайте ответ: «**выделен вибрион не O1 не O139 серогруппы**».

11.2. Исследование воды.

II этап (через 18 ч от начала исследования)

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

11.2.2. Высев с поверхности I среды накопления на пластинку ЩА (МПА).

III этап (через 24 ч от начала исследования)

11.2.3. Высев с поверхности II среды накопления на пластинку ЩА (МПА).

Материал и оборудование

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

ЗАНЯТИЕ 12

12.1. Исследование воды.

IV и V этап

12.1.1. Исследование посевов с I и II сред накопления:

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

- отсев 2–3 колоний, агглютинирующихся и неагглютинирующихся холерными сыворотками, на полиуглеводную среду (например, лактозосахарозную), косячок ЩА (МПА) и МПБ.

Инкубирование посевов при 37 °С.

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%-й ПВ и на 4 чашки ЩА (МПА). Через 3, 4, 5, 6 ч инкубирования при 37 °С приготовление мазков с 1%-й 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 (разведения 1 : 50). Через 15–20 мин выдать предварительный ответ (приложение 4.6.2).

Исследование нативного материала в РА в 1%-й ПВ и в пробе с диагностическими холерными классическим и эльтор бактериофагами (приложение 4.6.3):

- в разведенные в 1%-й ПВ в объеме 1 мл холерные сыворотки О1, Инаба, Огава (с 1 : 100 до титра) и контроль антигена (1 мл 1%-й 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).

При положительных результатах РА и данных микроскопии выдается окончательный ответ.

Постановка микрометодом РНГА и РТНГА с холерным иммуноглобулиновым эритроцитарным диагностикумом (приложение 4.6.3). Исследуемый материал предварительно прогревается в течение 20 мин при 100 °С. Через 2 ч выдача предварительного ответа.

Применение мультиплексного ПЦР-анализа нативного 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%-я ПВ рН 8,0–8,4	20 мл
1%-я ПВ рН 8,0–8,4 – 5–8 мл	2 пробирки
ЩА (МПА) рН 7,8–8,0	5 чашек
Агар Мартена рН 7,6–7,8	1 чашка
0,7%-й ПЖА рН 7,8–8,0	1 пробирка

МПБ pH 7,6–7,8	3 пробирки
Лактозо-сахарозная среда	3 пробирки
ЩА (МПА) pH 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
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. Идентификация культуры по основным признакам.

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

13.1.2. Микроскопия мазков, постановка слайд-агглютинации и РИВ с подозрительными колониями, используя агглютинирующие холерные О1 и О139 сыворотки.

При положительной слайд-агглютинации отсев 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 О1, Инаба и Огава, О139, разведенными 1%-й ПВ в объеме 1 мл (занятие 12);
- 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 °С. При наличии четких положительных признаков вида *V. cholerae* выдача окончательного ответа о выделении возбудителя холеры.

Материал и оборудование

МПБ pH 7,8–8,0	3 пробирки
0,7%-й ПЖА pH 7,6–7,8	2 пробирки
Агар Мартена pH 7,6–7,8	2 чашки
1%-я ПВ pH 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 орнитинном	1 пробирка
Среда Биргер-Крушинской (контроль)	1 пробирка
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

14.1.1. 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 °С в течение 30 мин и при необходимости сохраняются при 4 °С.

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 °С в течение 30 мин и подвергнуть исследованию.

Агглютинины у больных холерой появляются на 5–7 день заболевания и максимального титра обычно достигают 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 им-

муноглобулиновым 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 $37,0 \pm 0,5$ °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 (Домарадский И.В., Ерохин Е.П., 1971, Наумшина М.С. 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 O-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 трудоемкими 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 комплемента (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

15.1.1. Раститровать 1-ю и 2-ю инактивированные сыворотки двукратно в 1%-й 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%-й 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 °С в течение 1 ч, после чего провести предварительный учет результатов, затем пробирки помещаются в холодильник (при $4 \pm 0,5$ °С). На следующее утро проводится учет реакции.

15.2. Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови больного

Исследование сыворотки крови больного.

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

В восьми пробирках 10-кратно в объеме 0,9 мл (на льду, который помещается в любую емкость), раститровывается 2-я 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 °С 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 °С), после чего проводится подсчет количества выросших колоний.

Учет результатов. За титр ВА принимается максимальное разведение сыворотки, которое вызывает 50% 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 кроликке.

Материал и оборудование

1-я сыворотка, инактивированная при 56 °С в течение 30 минут, в разведении 1 : 5 (кровь взята на 3 день болезни)	2,5 мл
2-я 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</i> El Tor	1 пробирка
МПБ рН 7,8–8,0 4–5 мл	1 пробирка
1%-я ПВ рН 8,0–8,4 10 мл	1 пробирка
Комплемент 1 : 40	
Комплемент 1 : 5	10 мл
Диагностикум холерный эритроцитарный О-иммуноглобулиновый 0,6%-й 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 шт.

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
рН 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, рН доводят до $8,0 \pm 0,1$. 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%-я пептонная вода. Готовится из основного раствора пептона путем разведения его в 10 раз дистиллированной водой. После установления рН $8,5 \pm 0,1$ разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют 20 мин при давлении 0,7 атм.

Пептонная вода с теллуридом калия. В 1%-ю ПВ (рН $8,5 \pm 0,1$) после автоклавирования добавляют теллурид калия в разведении 1 : 100000 или 1 : 200000. Предварительно готовят рабочий 0,1% раствор теллурида калия (срок хранения 7 дней).

Срок хранения среды при 20–25 °С 48 ч, 4 °С – 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%-й 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
pH 7,6–7,8	

В мясную воду вносят пептон и хлорид натрия, перемешивают и подщелачивают 20%-м раствором едкого натра до pH 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 ± 2 °С. 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 рекомендуется). Агар разливают в посуду и стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

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 бычья сухая	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.

4.1.4. Среда 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
pH 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. Среда для идентификации.

Среда Гисса. К 100 мл 1%-й пептонной воды (pH 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%-го раствора бромтимолового синего.

Среды разливают в стерильные пробирки с поплавками и стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин; среду с l-арабинозной 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 °С и учет результатов производят 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%-м раствором едкого натрия до pH 7,4 ± 0,1, доводят объем среды до первоначального и добавляют 3 мл 1%-го 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 (pH 7,1 ± 0,1). При кислой реакции среда желтеет.

Среда Хью-Лейфсона используется для определения типа расщепления глюкозы (окисления-ферментации 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%-ю 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 (безводный)	0,1 г
Бромтимоловый синий (0,1%-й р-р в 20%-м 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%-м 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 флокюлята в средах не имеет значения. Пептонно-дрожжевая среда имеет травянисто-зеленый цвет, при кислой реакции среда желтеет, при щелочной – синее.

Мясопептонный бульон: мясная вода с 1 % сухого пептона и 0,85 % поваренной соли. Смесь кипятят до полного 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 уксуснокислого 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%-й раствор натрия хлорида	до 1000,0 мл

Стерилизуют на водяной бане или текучим паром при 100 °С 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* classical 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%-м 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, переноса по 0,5 мл в 4,5 мл 0,9% хлористого натрия до концентрации 1000 м.к. в 1 мл (разведение 10^3).

Для контроля щелочного агара 100 м.к. тест-культуры (0,1 мл из разведения 10^3) 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 °С 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%-й 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 вырастать (в среднем) не менее 30 и не более 70 колоний.

Посевы инкубируются в течение 6 ч при $37 \pm 0,5$ °С с последующим высеиванием из поверхностного слоя каждого объекта бактериологической петлей № 5 (5 мм) на агаровые пластинки контрольной среды. После выращивания посевов при $37 \pm 0,5$ °С 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%-й (1 : 4000) раствор теллурида 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 теллурида калия в 200 мл стерильной дистиллированной воды.

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

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

Проверка годности теллурида 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 дает 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 ТСБС).

Определение типа расщепления глюкозы (тест Хью-Лейфсона).

В две пробирки со средой Хью-Лейфсона засевают 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 $37 \pm 0,5$ °С. 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, орнитинном, аргинином и контролем (среда без аминокислоты) засеивается по полной бактериологической петле 18-часовой агаровой культуры. Посевы инкубируются при $37 \pm 0,5$ °С. 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 – синее. 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, Андреде.

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 $37 \pm 0,5$ °С. 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 $37 \pm 0,5$ °С. Через 18 ч в пробирку со средой Кодама добавляется 2–3 капли раствора Люголя. При разложении крахмала среда не окрашивается.

Выявление способности к биолюминесценции. Изучаемые штаммы засеиваются в 1%-ю пептонную воду или на пластинки щелочного ага-

ра, инкубируются при температуре $37 \pm 0,5$ °С 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 $37,0 \pm 0,5$ °С 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.

Идентификация культур по биохимической активности с использованием тест-систем и системы индикаторной бумажной. Для определения оксидазы, образования индола и сероводорода, декарбонизации лизина или орнитина, дигидролазы аргинина, ферментации углеводов и многоатомных спиртов при идентификации вибрионов можно использовать систему индикаторную бумажную и тест-системы для биохимической идентификации вибрионов согласно инструкции по их применению.

4.6.2. Методы выявления антигенов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп

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. суспензию холерных вибрионов в 0,9%-м растворе хлористого натрия. Для РА с RO сывороткой антиген готовится на дистиллированной воде.

Для исключения спонтанной агглютинации рекомендуется ставить развернутую реакцию в 0,3%-м растворе NaCl. Диагностические сыворотки двукратно разводятся 0,3%-м 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%-м раствором натрия хлорида до концентрации 1 млрд м.к./мл, добавляя ее по 0,5 мл во все разведения сыворотки и контроль культуры (0,5 мл 0,3%-го 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-й и II-й 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 $37 \pm 0,5$ °C или комнатной 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, pH 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 – $4,3 \times 10^5$ 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 просматрива-

ются под микроскопом при увеличении $\times 400-600$, 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 подрачивания в 1% пептонной воде.

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

4.6.3. Серологические методы

Серологические методы исследования, как правило, имеют дополнительное значение, и лишь в отдельных случаях при проведении оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа их результаты могут быть решающими.

Для серологической диагностики холеры используют иммунологические реакции, выявляющие в сыворотке крови больных, переболевших и вибрионосителей, а также вакцинированных специфические антитела: агглютинины и вибриоцидные антитела.

У больных холерой на 5–7 день от начала заболевания появляются агглютинины, вибриоцидные антитела.

Целесообразно исследовать парные сыворотки с интервалом в 7–10 дней. Первая проба должна быть взята на 5–7 день для оперативной диагностики, вторая – через 7–10 дней и более – для ретроспективной.

Кровь для серологических исследований берут из вены, а при отсутствии такой возможности – из пальца. Из вены берут 1–5 мл крови, после свертывания сгусток отслаивают от стенки пробирки стерильной стеклянной палочкой или платиновой петлей. Пробирки сохраняют в холодильнике и транспортируют в лабораторию охлажденными (в термосе, сумке-холодильнике и др.). В лаборатории сыворотку инактивируют при температуре $56,0 \pm 0,5$ °C в течение 30 мин.

Если кровь забирают в день постановки реакции, пробирки со свернувшейся кровью необходимо центрифугировать 10–15 мин при 3000 об/мин. При отсутствии возможности исследовать сыворотку немедленно ее сохраняют при температуре $4,0 \pm 0,5$ °C. Кровь из пальца

берут в объеме 0,4 мл и вносят в пробирку с 1,6 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия (1 : 4).

Определение агглютининов в сыворотке крови.

Метод постановки развернутой реакции агглютинации (макрометод). Исследуемую сыворотку крови разводят 1%-й пептонной водой рН $7,5 \pm 0,1$ в объеме 1 мл от 1 : 10 до 1 : 640. В качестве антигена используют 3-часовую бульонную культуру, выделенную в данном очаге, или исследуют в 3-х рядах с культурами холерных вибрионов (сероваров Огава, Инаба и O139 серогруппы). В пробирку с раститрованной сывороткой вносят по 1 капле культуры-антигена и ставят на 1 ч в термостат, затем до утра в холодильник при температуре $4,0 \pm 0,5$ °С, после чего отмечают результаты. Реакция сопровождается контролями антигена и сыворотки.

При определении титра реакции учитывают разведения с агглютинацией на 3–4 креста.

Результат исследования сыворотки больного при реакции агглютинации в разведении 1 : 40 и выше считается ориентировочно положительным.

Диагностическое значение имеет не менее чем 4-кратное нарастание титров антител.

Метод постановки реакции агглютинации в микрообъеме

Материалы и оборудование

- микропланшеты для иммунологических реакций с круглодонными лунками и прозрачными крышками;
- механические 1-, 4- и 8-канальные дозаторы с переменным объемом 50–200 мкл и соответствующие наконечники;
- кюветы (поддоны) эмалированные или из нержавеющей стали;
- стереомикроскоп типа МБС-10;
- культура холерного вибриона, выделенная в данном очаге, или тест-штаммы холерных вибрионов O1 (сероваров Огава и Инаба) и O139 серогрупп (допускается использование инактивированных культур).

Постановка реакции агглютинации (далее – РА). Реакция осуществляется в объеме 0,1 мл (100 мкл). Готовят суспензию культуры (антигена) холерного вибриона, выделенного в данном очаге, или тест-штаммов холерных вибрионов O1 (сероваров Огава и Инаба) и O139 серогрупп в 3–4 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия из 6–18-часовой агаровой культуры до концентрации $2,0 \times 10^9$ м.к./мл, стандартизованную по оптическому отраслевому стандарту мутности бактериальных взвесей, калиброванному в международных единицах (МЕ) – 10 МЕ и с действующим сроком годности.

Микропланшеты маркируют, надписывая карандашом с левой стороны номер исследуемой сыворотки, а сверху пропорцию ее разведения от 1 : 5 до 1 : 640, номер штамма (живой или инактивированной культуры).

В лунки каждого ряда дозаторами разливают по 50 мкл 0,9%-го раствора хлорида натрия. Затем в 1-ю лунку вносят 50 мкл исследуемой сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, в разведении 1 : 5 и проводят двукратное ее разведение микропипеткой на 50 мкл, из последней лунки удаляют 50 мкл. Затем в каждую лунку вносят 50 мкл суспензии культуры (антиген) в концентрации $2,0 \times 10^9$ м.к. в 1 мл. Реакция сопровождается контролями антигена (антигенов) и исследуемой сыворотки. Планшет накрывают крышкой и помещают в термостат при температуре 37 ± 1 °С на 2 ч.

Учет реакции. Учет реакции проводят в косо проходящем свете под стереомикроскопом (приложение 5 к настоящим МУК).

Реакцию оценивают по характеру агглютинации на дне лунки:

- полная агглютинация: наличие на дне лунки рыхлой разорванной пленки, четких хлопьев на фоне темного поля;
- неполная агглютинация: наличие нежной пленки и полиморфных комочков агглютината на темном фоне;
- слабая агглютинация: наличие мелких хлопьев на фоне сероватого поля;
- следы агглютинации: мелкие единичные хлопья на фоне мутной жидкости.

Реакцию оценивают отрицательно, когда в лунке вибрионы равномерно выстилают дно или собираются в «пуговку». Под микроскопом видно равномерное мелкозернистое поле без темных промежутков.

Положительной считают реакцию при наличии полной и неполной агглютинации.

При постановке реакции агглютинации в микрообъеме дополнительно предусматривают следующее:

- планшеты помещают на поддон (из нержавеющей стали или эмалированный). На дно поддона предварительно расстилают марлевую салфетку, пропитанную дезинфицирующим раствором (3%-й раствор хлорамина);
- после внесения дозатором в каждую лунку 50 мкл суспензии живых культур холерных вибрионов в дозе $2,0 \times 10^9$ м.к./мл планшет накрывают крышкой и на подносе ставят в термостат при температуре 37 ± 1 °С на 2 ч;
- для учета реакции поднос с планшетом переносят на лабораторный стол, затем планшет ставят на стеклянную подставку и оценивают

характер реакции агглютинации в косо проходящем свете с помощью стереоскопического микроскопа;

- при учете реакции крышку с планшета не снимают. В случае запотевания крышки ее меняют на другую, а запотевшую помещают в емкость с 3%-м раствором хлорамина;

- после учета реакции крышку снимают, планшет и крышку помещают в кювет, заливают 3%-м раствором хлорамина, накрывают и оставляют на 24 ч. Разовые планшеты обеззараживают физическим способом – автоклавированием при 1,5 атм. см в течение 60 мин. Стеклоянную крышку столика приспособления для косоого освещения обрабатывают 70%-м спиртом.

Реакция агломерации объемная (далее – РАО). Для выявления противохолерных антител в сыворотках крови больных и лиц с подозрением на заболевание холерой используют РАО с диагностикумом холерным антигенным полимерным. Для этого исследуемую сыворотку разводят 0,9%-м раствором хлорида натрия в пропорции 1 : 5.

Приготовление ингредиентов для РАО. Содержимое флакона с сухой нормальной кроличьей сывороткой (далее – ИКС) 1 : 10 растворяют в 5 мл 0,9%-го забуференного раствора хлорида натрия (далее – ЗРХН). Приготовленный раствор ИКС 1 : 100 можно хранить при температуре 2–6 °С в течение 5 дней. Содержимое флакона с диагностикумом холерным антигенным полимерным О1 ресуспендируют в 4 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия. Приготовленный раствор рекомендуется использовать в течение 24 ч.

У-образные лунки планшета для иммунологических реакций разливают по 50 мкл 1%-го раствора НКС. Исследуемые сыворотки от больных в рабочем разведении (1 : 5) в количестве 50 мкл вносят в первую лунку пипеткой-дозатором и делают двукратные последовательные разведения, удаляя из последней лунки 50 мкл раствора. Затем во все лунки добавляют пипеткой-дозатором по 25 мкл диагностикума холерного антигенного полимерного О1 в рабочем разведении. В процессе постановки реакции флакон с диагностикумом необходимо периодически встряхивать.

После добавления всех реагентов содержимое лунок перемешивают покачиванием планшета в течение 1 мин и оставляют при температуре 20 ± 2 °С на 2–2,5 ч.

Постановку контролей производят следующим способом. В лунках, содержащих по 50 мкл НКС, титруют положительный контроль – сыворотку диагностическую холерную О1. Для контроля диагностикума на отсутствие спонтанной агломерации в 2 лунки вносят 50 мкл НКС. Затем во все лунки добавляют по 25 мкл диагностикума холерного антигенного полимерного О1.

Одного набора реагентов достаточно для исследования 7–11 сывороток.

Учет результатов реакции производится через 2–2,5 ч. За положительный результат реакции принимают образование цветного ярко-розового агломерата, выстилающего все дно лунки равномерным слоем (зонтик). Положительная реакция указывает на наличие противохолерных антител. Минимальный специфический титр составляет 1 : 40. Титр положительно-контроля, свидетельствующий о качественной работе диагностикума, 1 : 640–1 : 5120. В случае отрицательного результата образуется компактное колечко или «точка» в центре лунки (пуговка), что указывает на отсутствие противохолерных антител в исследуемой сыворотке.

Определение вибриоцидных антител

Вибриоцидные антитела (далее – ВА) в крови больных обнаруживаются с 3–9 дня болезни в титрах 10^{-1} – 10^{-3} и достигают максимальных значений 10^{-4} – 10^{-8} к 10–16 сут, а затем резко снижаются до титров 10^{-3} – 10^{-2} и ниже. Принцип метода заключается в том, что в присутствии вибриоцидных антител не происходит размножения холерных вибрионов.

При проведении серологических исследований в очаге с определенной серологической характеристикой возбудителя в реакции используют один штамм соответствующего серовара. При отсутствии этих данных – штаммы O1 холерных вибрионов обоих сероваров и холерных вибрионов O139 серогруппы.

Определение ВА в сыворотке крови по чашечному методу Финкельштейна (Finkelstain, 1962).

Материалы и оборудование:

- исследуемые сыворотки, инактивированные прогреванием в течение 30 мин при температуре $56,0 \pm 0,5$ °С;
- сухой комплемент или свежеполученная сыворотка морской свинки в разведении 1 : 20;
- 0,9%-й раствор хлорида натрия рН $7,2 \pm 0,1$;
- штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы сероваров Огава и Инаба и O139 серогруппы, типичные, в S-форме, не чувствительные к комплементу;
- чашки Петри с щелочным или другим питательным агаром;
- лоток со льдом;
- термостат на $37,0 \pm 1,0$ °С.

Методика постановки реакции. Комплемент, разведенный 0,9%-м раствором хлорида натрия 1 : 20, разливают в два ряда пробирок по 0,9 мл. В первую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки и после тщательного перемешивания последовательно, меняя пипетки, переносят

по 0,1 мл до разведения 10^{-10} , получая десятикратные разведения сыворотки в объеме 0,9 мл. Титрацию сыворотки проводят на льду, который помещают в любую емкость.

Из односуточной агаровой культуры холерного вибриона готовят взвесь в 0,9% растворе хлорида натрия, содержащую $1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$ м.к./мл. Стерильной градуированной пипеткой полученную взвесь по 0,1 мл вносят в опытные пробирки с титрованной сывороткой.

Ставят следующие контроли:

- а) контроль комплемента (0,9 мл комплемента и 0,1 мл культуры);
- б) контроль сыворотки (0,8 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия, 0,1 мл сыворотки и 0,1 мл культуры);
- в) контроль культуры (0,9 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия и 0,1 мл культуры).

Штатив с пробирками на 1 ч помещают в водяную баню или термостат при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С, сделав предварительно высев из пробирки контроля культуры на пластинки ЩА для определения фактической концентрации живых вибрионов в опытной суспензии (контроль разведения).

Через 1 ч штатив вновь ставят на лед и из каждой пробирки отдельной стерильной пипеткой 0,1 мл культуры высевают на чашку с ЩА рН $8,0 \pm 0,2$. Посев равномерно распределяют по поверхности чашки покачиванием или шпателем. Чашки помещают на 18–24 ч в термостат при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С, после инкубации подсчитывают количество выросших колоний.

В посевах из контрольных пробирок с культурой должно вырастать количество колоний, близкое к контролю разведения.

Вибриоцидным титром считают максимальное разведение сыворотки, которое вызывает гибель не менее чем 50 % клеток холерного вибриона, что выявляется при посеве на агаровые пластинки в чашки Петри, по сравнению с количеством выросших колоний из пробирки контроля комплемента.

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 также после 18–24 ч инкубации при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С выросло 36 колоний, 50 % от этого числа будет составлять 18. Из 5-й пробирки выросло 15 колоний, т.е. меньше 50 % от количества колоний в контроле (18), в следующей – 30, т.е. более 50 % этого же показателя. Разведение сыворотки в 5-й пробирке составляет 10^{-5} , следовательно, вибриоцидный титр в данном примере будет составлять 10^{-5} (рис. 4).


Схема постановки реакции							
№	Ингредиенты	Разведения					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	и так далее до 10 ⁻¹⁰
1	Комплемент разведенный 0,9%-м раствором NaCl до 1 : 20	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
2	Исследуемая сыворотка (инактивируемая при 56°С 30', адсорбированная 50%-й взвесью эритроцитов барана)						
		Титрацию сыворотки проводят на льду					
3	<i>V. cholerae</i> O1 Огава или Инаба или O139 10 ³ м.к./мл в 1 % ПВ	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4	Инкубация при 37° в течение 1 ч						
5	Через 1 ч штатив ставят на лед и делают высев из каждой пробирки по 0,1 на ЩА						
6	Инкубация при 37° в течение 18–24 ч						
7	Учет результатов (по количеству выросших колоний на пластинке ЩА)	0	3	10	15 < 50 % от контроля разведения	30	38
8	Величина титра				Титр 10 ⁻⁴		
Схема постановки контролей ингредиентов							
№		Контроли					
		сыворотки	комплемента	культуры			
1	Исследуемая сыворотка	0,1	–	–			
2	<i>V. cholerae</i> O1 (O139) 10 ³ м.к./мл	0,1	0,1	0,1			
3	Комплемент (1 : 20)	–	0,9	–			
4	0,9%-й раствор NaCl	0,8	–	0,9			

Рис. 4. Схема определения ВА в сыворотке крови по Finkelstein.

Определение ВА в сыворотке крови на основе ферментации углеводов.

Об отсутствии или наличии ВА судят по ферментации сахарозы, регистрируемой с помощью индикатора.

Материалы и оборудование.

- инактивированная при 56 °С в течение 30 мин исследуемая сыворотка крови;
- штаммы холерного вибриона серовара Огава и Инаба;
- комплемент, разведенный 1 : 20 1% пептонной водой, содержащей 1 % сахарозы и 1 % индикатора Андресе;
- лоток со льдом;
- термостат на $37,0 \pm 1,0$ °С.

Методика постановки реакции. Комплемент, разведенный 1 : 20 1%-й пептонной водой с сахарозой и индикатором Андресе разливают в пробирки по 0,45 мл, штативы с пробирками помещают в лоток со льдом. В первую пробирку добавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки и после тщательного перемешивания, меняя пипетки, переносят 0,05 мл смеси во вторую пробирку, из второй в третью и т.д. (до разведения 10^{-5} – 10^{-9}). Готовят суспензию 18–20-часовой агаровой культуры холерного вибриона и разводят 1% пептонной водой до концентрации 10^{-3} м.к. в 1 мл.

Во все пробирки вносят по 0,45 мл суспензии и помещают в термостат.

Постановку реакции сопровождают следующими контролями:

- 0,45 мл 1%-й пептонной воды, содержащей 1 % сахарозы и 1 % индикатора Андресе + 0,05 мл исследуемой сыворотки + 0,45 мл взвеси культуры (контроль сыворотки);
- 0,45 мл комплемента с сахарозой и индикатором + 0,45 мл культуры (контроль комплемента);
- 0,45 мл 1%-й пептонной воды с сахарозой и индикатором + 0,45 мл культуры (контроль культуры);
- 0,45 мл 1%-й пептонной воды с сахарозой и индикатором + 0,05 мл исследуемой сыворотки (контроль стерильности сыворотки).

Через 5–6 ч инкубации проводят учет реакции. При этом в контролях (кроме контроля стерильности сыворотки) цвет содержимого пробирок должен перейти в красный или розовый. Изменение цвета индикатора в пробирках рабочего ряда, связанное с ферментацией сахарозы размножившимися вибрионами, свидетельствует об отсутствии вибриоцидных антител в исследуемой сыворотке. За вибриоцидный титр принимают то наибольшее разведение сыворотки, при котором цвет содержимого пробирок остается неизменным или интенсивность его значительно отличается от окраски контрольных проб. Результат выражают в виде десятичного логарифма разведения сыворотки, взятого с обратным знаком.

Примечание.

Для постановки РВА при холере, обусловленной холерным вибрионом O139 серогруппы, не может быть использован выделенный в очаге штамм в связи с его возможной чувствительностью к комплементу.

В этих случаях сыворотку крови в установленном порядке направляют в референс-центр по мониторингу за холерой.

Схема определения ВА в сыворотке крови на основе ферментации углеводов представлена на рисунке 5.


Схема постановки реакции							
№	Ингредиенты	Разведения					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	и так далее до 10 ⁻¹⁰
1	Комплемент разведенный 1%-й ПВ до 1 : 20 +1 % С + 1% И	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
2	Исследуемая сыворотка (инактивируемая при 56 °С 30', адсорбированная 50%-й взвесью эритроцитов барана)	0,05 					
		Титрацию сыворотки проводят на льду					
3	<i>V. cholerae</i> O1 (Огава или Инаба) или O139 10 ³ м.к./мл в 1%-м ПВ	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
4	Инкубация при 37° в течение 5–6 ч						
5	Учет	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	+ Наличие роста	+ Наличие роста	+ Наличие роста
6	Величина титра				Титр 10 ⁻⁴		
Схема постановки контролей ингредиентов							
№	Ингредиенты	Контроли					
		сыворотки	комплемента	культуры			
1	Исследуемая сыворотка	0,05	–	0,05			
2	<i>V. cholerae</i> O1 (O139) 10 ³ м.к./мл	0,45	0,45	–			
3	Комплемент разведенный 1%-й ПВ до 1 : 20 +1 % С + 1% И	–	0,45	–			
4	1%-я ПВ до 1 : 20 +1 % С + 1% И	0,45	–	0,45			
5	Учет результатов через 5–6 ч	+ Наличие роста	+ Наличие роста	Отсутствие роста			

Рис. 5. Схема определения ВА в сыворотке крови на основе ферментации углеводов.

Тактика применения серологических реакций. При выборе оптимальных схем серологического исследования необходимо учитывать диагностическую ценность той или иной реакции в разные сроки обследования от начала заболевания, чувствительность и специфичность реакций, а также трудоемкость их постановки, что объясняет ограничение возможности использования РВА с сыворотками крови при массовых исследованиях.

Во многих случаях выбор сочетания основных двух реакций (РА и РАО) позволяет решать разные задачи серологической диагностики в зависимости от сроков обследования, экономить средства и силы, а также без потери информативности исключить повторный забор крови для исследования.

Одновременное использование основных иммунологических реакций и дополнительных (РВА в сыворотке крови по методу Финкельштейна и на основе ферментации углеводов), направленных на выявление различных видов антител, повышает достоверность результативности анализов и в ряде случаев исключает обследование в динамике.

При массовых исследованиях первичную (отборочную) постановку серологических тестов целесообразнее проводить в 3-х разведениях (лунках), а при необходимости ускоренного ответа – в развернутом варианте в 6–10 лунках в зависимости от чувствительности теста.

4.6.4. Тесты дифференциации биоваров *V. cholerae* O1 серогруппы Дифференциация биоваров холерных вибрионов O1 серогруппы методом ПЦР. В связи с тем, что в последние годы все чаще выделяют культуры холерных вибрионов, не лизирующиеся холерными диагностическими бактериофагами, а тест дифференциации биоваров (образование ацетилметилкарбинола в реакции Фогес–Проскауэра) не дает однозначного трактования результатов, основным методом определения биовара является ПЦР.

Для проведения исследования используются зарегистрированные генодиагностические препараты. Идентификацию проводят в соответствии с инструкциями по применению.

Постановка реакции Фогес–Проскауэра (на ацетилметилкарбинол). Испытуемая культура засеивается в глюкозо-фосфатный бульон Кларка и инкубируется при температуре $37 \pm 0,5$ °C в течение 1–3 суток. Затем к 1 мл культуры добавляется 0,6 мл 6%-го спиртового раствора а-нафтола и 0,4 мл 40%-го раствора едкого калия. Пробирки встряхиваются и помещаются в термостат на 1 ч. При положительной реакции среда окрашивается в розовый или ярко-красный цвет.

4.6.5. Тесты межвидовой дифференциации патогенных для человека вибрионов.

Определение галофильности вибрионов. Суточная агаровая культура исследуемого штамма засеивается в 1%-ю пептонную воду с 3 % NaCl. Через 3–4 ч инкубации при 37 °С 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.

4.6.6. Оценка эпидемической значимости холерных вибрионов.

Основным методом определения эпидемической значимости или токсигенности выделенных культур холерных вибрионов является ПЦР. В бактериологических лабораториях, не имеющих возможности использовать ПЦР, можно поставить пробу Грейга или прямое тестирование продукции холерного токсина (далее – СТ) с помощью ИФА или ИХА, в которых используются специфические антитела к СТ.

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%-й взвеси трижды отмытых эритроцитов барана в физиологическом растворе. Смесь микробов и эритроцитов осторожно перемешивается встряхиванием и помещается на 2 ч в термостат при температуре $37 \pm 0,5$ °С, 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 дефибрированная кровь барана, консервированная борной кислотой. Консервированные эритроциты сохраняют свои свойства в течение 3-х месяцев. Перед постановкой пробы на гемолиз дефибрированную 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%-я взвесь в физиологическом растворе, ко-

тору можно хранить при 4 °С 2-3 дня и использовать для постановки пробы Грейга описанным выше способом.

Определение эпидемической опасности холерных вибрионов на основании выявления продукции СТ методом ИФА. При исследовании культур холерных вибрионов обязательно проводится предварительное их культивирование в бульоне АК1 (авторское наименование) (1,5 % бакто-пептона, 0,4 % дрожжевого экстракта, 0,5 % NaCl, 0,3 % NaHCO₂) для индукции СТ в бульон. Пробы биологического материала могут быть исследованы нативными, поскольку содержат СТ, продуцируемый холерными вибрионами в условиях *in vivo*, либо после предварительного подращивания в бульоне АК1, способствующего увеличению количества СТ в пробе, что играет важную роль при анализе материала от вибрионосителей, у которых концентрация возбудителя может быть не выше $1,0 \times 10^2$ м.к./мл.

Для определения СТ используют зарегистрированный препарат для определения продукции холерного токсина иммуноферментным методом. Работу проводят в соответствии с инструкцией к диагностическому препарату.

Определение продукции СТ методом GM1-ELISA (ИФА). Для определения продукции штаммами вибрионов холерного токсина может быть использован метод GM1-ELISA (англ. ganglioside-capture enzyme-linked immunosorbent assay), рекомендованный ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения) и CDC (англ. Center for Disease Control and Prevention).

Культивирование холерных вибрионов для индукции холерного токсина в соответствии с рекомендациями CDC.

Три колонии (диаметр 2–3 мм) исследуемого штамма или ½ петли (№ 5) агаровой культуры засевают в стеклянную пробирку, содержащую 10 мл бульона АК1, и инкубируют 3,5–4 ч при температуре 30 °С (первичное подращивание). Далее всю культуру переносят во флакон, содержащий 250 мл среды АК1, и инкубируют при температуре 30 °С в течение 17–19 ч при постоянном помешивании 250 об/мин на орбитальном термостатируемом шейкере. В полученном бульоне определяют наличие СТ.

Определение СТ. Для проведения исследований готовят растворы фосфатного-солевого буфера (ФСБ); ФСБ с 1%-м бычьим сывороточным альбумином (БСА); ФСБ с 0,1%-м БСА; ФСБ с 0,05%-м твин-20; раствор кислоты лимонной; раствор натрия цитрата; раствор АВТС (англ. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid – диаммониевая соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната); 33%-й раствор перекиси водорода; раствор ганглиозида GM1 в ФСБ; рабочий раствор кроличьей антиэнтеротоксической сыворотки, рабочий раствор анти-

кроличьих антител, меченных пероксидазой хрена; рабочий раствор коммерческого холерного токсина (положительный контроль).

ФСБ: 5 таблеток ФСБ растворяют в 500 мл воды очищенной. Раствор хранят в холодильнике при температуре 5 ± 3 °C не более 3 суток.

ФСБ с 1%-м БСА: сухую навеску БСА массой 0,5 г смешивают с 50 мл ФСБ, тщательно размешивают. Раствор хранят в холодильнике при температуре 5 ± 3 °C не более 3 суток.

ФСБ с 0,1% БСА: сухую навеску БСА массой 0,05 г смешивают с 50 мл ФСБ, тщательно размешивают. Раствор хранят в холодильнике при температуре 5 ± 3 °C в течение 3 суток.

ФСБ с 0,05% твин-20: к 300 мл ФСБ добавляют 0,015 мл твин-20 и тщательно перемешивают, не допуская образования пузырей. Раствор хранят в холодильнике при температуре 5 ± 3 °C не более 3 суток.

Раствор кислоты лимонной: сухую навеску кислоты лимонной массой 0,18 г растворяют в 16,2 мл воды очищенной. Раствор хранят в холодильнике при температуре 5 ± 3 °C не более 3 суток.

Раствор натрия цитрата: сухую навеску натрия цитрата массой 0,20 г растворяют в 13,8 мл воды очищенной. Раствор хранят в холодильнике при температуре 5 ± 3 °C не более 3 суток.

Раствор АВТС: сухую навеску диаммониевой соли 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоната массой 0,0067 г растворяют в 0,3 мл воды очищенной). Раствор хранят в холодильнике при температуре 5 ± 3 °C в течение 3 суток.

33%-й раствор перекиси водорода: таблетку гидроперита растворяют в 4,5 мл воды очищенной при перемешивании в течение 30 мин, получая 33%-й раствор перекиси водорода. Хранят в плотно закупоренном флаконе в холодильнике при температуре 5 ± 3 °C не более 3 суток.

Перед постановкой теста готовят рабочие растворы ингредиентов.

Рабочий раствор ганглиозида GM1 в ФСБ: сухую навеску ганглиозида массой 1 мг растворяют в 1 мл ФСБ, получая концентрацию 1 мг/мл. Из этого раствора готовят разведение с концентрацией 1 мкг/мл, для чего в микроцентрифужную пробирку вносят 999 мкл ФСБ и 1 мкл раствора ганглиозида GM1 с концентрацией 1 мг/мл. Для приготовления рабочего разведения ганглиозида GM1 (2 нг/мл) в пробирке *extempore* смешивают 9980 мкл ФСБ и 20 мкл раствора ганглиозида GM1 в концентрации 1 мкг/мл.

Рабочий раствор кроличьей антиэнтеротоксической сыворотки: к 12 мл ФСБ с 0,1%-м БСА добавляют 1,5 мкл кроличьей антиэнтеротоксической сыворотки (конечное разведение сыворотки 1 : 8000).

Рабочий раствор антикроличьих антител, меченных пероксидазой хрена: к 15 мл ФСБ с 0,1%-м БСА добавляют 0,5 мкл антикроличьих

антител, меченных пероксидазой хрена (конечное разведение антител 1 : 30000).

Субстратная смесь: субстратную смесь готовят непосредственно перед внесением в лунки. Для этого объединяют 16,2 мл раствора лимонной кислоты и 13,8 мл раствора цитрата натрия, добавляют 0,3 мл раствора АВТС и 15 мкл 33% раствора перекиси водорода.

Рабочий раствор ХТ (положительный контроль): сухую навеску СТ массой 1 мг растворяют в 1000 мкл воды очищенной. Готовят основное разведение ХТ с конечной концентрацией 1 мкг/мл, для чего смешивают в микроцентрифужной пробирке 999 мкл воды очищенной и 1 мкл раствора СТ с концентрацией 1 мг/мл. Для приготовления рабочего разведения ХТ (20 нг/мл на две лунки) в микроцентрифужной пробирке смешивают 245 мкл воды очищенной и 5 мкл раствора ХТ с концентрацией 1 мкг/мл.

Проведение анализа. В лунки 96-луночного планшета для постановки ИФА вносят по 100 мкл раствора моносиалоганглиозида GM1 в концентрации 2 нг/мл и проводят сорбцию при температуре 35–37 °С в течение 4 часов или при комнатной температуре в течение ночи.

Проводят трехкратную отмывку ФСБ с 0,05%-м твин-20 по 200 мкл на лунку.

Перед началом анализа проводят блокировку свободных участков связывания ФСБ с 1%-м бычьим сывороточным альбумином (БСА). Блокирующий раствор вносят по 150 мкл на лунку и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 минут. Планшеты отмывают трехкратно ФСБ с 0,05%-м твин-20 по 200 мкл на лунку.

Затем в лунки вносят по 100 мкл бульонной культуры холерных вибрионов, также в две лунки вносят по 100 мкл рабочего раствора холерного токсина (20 нг/мл) – положительный контроль, и в две лунки – по 100 мкл ФСБ (отрицательный контроль). Планшет инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 часа. Затем проводят трехкратную отмывку ФСБ с 0,05%-м твин-20 по 200 мкл на лунку.

После трехкратной отмывки в лунки вносят по 150 мкл ФСБ с 1%-м БСА и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем проводят трехкратную отмывку ФСБ с 0,05%-м твин-20 по 200 мкл на лунку.

После трехкратной отмывки в лунки вносят по 100 мкл рабочего раствора кроличьей антиэнтеротоксической сыворотки в разведении 1 : 8000 и инкубируют при температуре 35 °С в течение 1 часа. Затем проводят трехкратную отмывку ФСБ с 0,05% твин-20 по 200 мкл на лунку.

Затем вносят по 100 мкл рабочего раствора антикроличьих антител, меченных пероксидазой хрена в разведении 1 : 30000 и инкубируют

при температуре 35–37 °С в течение 1 часа. Затем проводят трехкратную отмывку ФСБ с 0,05%-м твин-20 по 200 мкл на лунку.

После трехкратной отмывки в лунки вносят по 100 мкл субстратной смеси и инкубируют при комнатной температуре до появления окраски в лунке с положительным контролем в течение 10–20 мин. Время инкубации не должно превышать 30 мин. После чего производят учет результатов.

Учет результатов. Учет результатов осуществляют с использованием мультисканального фотометра при длине волны 405 нм. Перед началом учета содержимое лунок перемешивали осторожным постукиванием по планшету до получения гомогенного зелено-голубого раствора.

Реакция подлежала учету при условии появления зелено-голубого окрашивания в лунке с положительным контрольным образцом, а также при отсутствии или наличии слабого зеленоватого окрашивания в отрицательном контроле.

При инструментальном учете измеряют оптическую плотность (ОП) в лунках, рассчитывая среднее арифметическое значение в лунках с отрицательным контрольным образцом – Опср(К–). Результат анализа считают положительным, если $ОПобр \geq ОПср(К-) \times 2$. Результат анализа считают отрицательным, если $ОПобр \leq ОПср(К-) \times 2$ (ОПобр – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом).

Определение эпидемической опасности холерных вибрионов на основании прямого выявления СТ методом ИХ. Для проведения исследований используют зарегистрированный набор реагентов, предназначенных для ускоренного выявления и идентификации токсигенных штаммов *V. cholerae*. Набор реагентов обеспечивает выявление и идентификацию холерного токсина при концентрации не ниже 10 нг/мл в питательном бульоне, полученном после культивирования токсигенных штаммов *V. cholerae* в условиях, обеспечивающих токсинообразование. Работу проводят в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

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

Определение эпидемической значимости холерных вибрионов на основании выявления генов *ctxAB* и *tcpAB* методом ПЦР. Для проведения исследований используют зарегистрированные генодиагностические препараты в соответствии с инструкциями по применению.

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%-м растворе натрия хлорида по стандартному образцу мутности 5 единиц ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора. Далее проводятся 10-кратные разведения до концентрации взвеси 1×10^7 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
10 × ПЦР буфер	– 2,5 мкл
дНТФ	– 2,5 мкл
MgCl ₂	– 1,0 мкл
Праймер <i>ctx2</i>	– 1,0 мкл
Праймер <i>ctx3</i>	– 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).

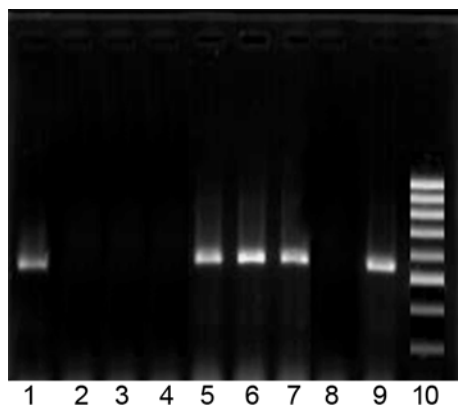


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *ctxA* (1, 5–7 *ctxA*⁺ пробы – эпидемически опасные штаммы; 2–4 *ctxA*⁻ пробы – эпидемически неопасные штаммы; 8 – отрицательный контроль; 9 – положительный контроль; 10 – маркер молекулярного веса GeneRuler™ 100bp DNA Ladder).

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

Идентификация и оценка эпидемической значимости *V. cholerae* методом ПЦР с гибридизационно-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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс *Vibrio cholerae* -FL»).

Подготовка проб и выделение ДНК проводится как описано выше и в соответствии с 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* «Tun»:

- *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-FEP/FRT *V. cholerae* скрин и ПЦР-смесь-1-FEP/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 (ВК+) – в пробирку с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *V. cholerae* скрин вносится 10 мкл ПКО ВК).

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 °C	- 10 с
Количество циклов	- 35

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

Учет и анализ результатов

Анализ результатов амплификации с ПЦР-смесью-1-FEP/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-FEP/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 (рис. 7).

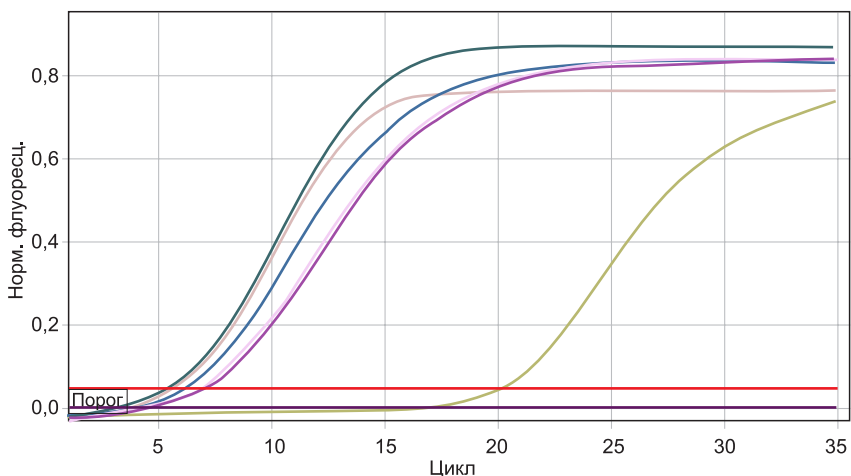


Рис. 7. Кривые флуоресценции исследуемых проб по каналу FAM/Green.

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 (табл. 4).

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 4

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 Ct цикла по каналу					
	FAM/ Green (ctxA)	JOE/ Yellow (BKO)	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 НЕ токсигенный	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V. cholerae</i> O139 НЕ токсигенный	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения

<i>V. cholerae</i> НЕ О1 и НЕ О139	Нет значений	< грани- чного значения	Нет значений	Нет значений	< граничного значения	Нет значений
Холерные вибрионы НЕ обнаружены	Нет значений	< грани- чного значения	Нет значений	Нет значений	Нет значений	Нет значений

4.6.7. Определение чувствительности холерных вибрионов к антибиотикам

Чувствительность холерных вибрионов к антибиотикам определяют количественным методом серийных разведений в агаре (далее – МСР) и дискодиффузионным методом (далее – ДДМ) в соответствии с методическими указаниями.

Для определения чувствительности холерных вибрионов к антибактериальным препаратам обоими методами (МСР и ДДМ) может быть использован агар Мюллера–Хинтона (Muller–Hinton), pH $7,3 \pm 0,2$ или агар Хоттингера, pH $7,2 \pm 0,1$ (1,2–1,4 г/л аминного азота, 1,5–2 % агара) и для ДДМ дополнительно агар Гивенталья–Ведьминой (АГВ), pH $7,4 \pm 0,2$. Прежде чем использовать в работе серии питательных сред, необходимо оценить соответствие значений МПК и диаметров зон подавления роста (это и контроль качества дисков) на используемой среде допустимым колебаниям величин этих показателей для контрольных штаммов микроорганизмов.

Для определения чувствительности/устойчивости холерных вибрионов используют антибактериальные препараты, рекомендованные методическими указаниями для экстренной профилактики и лечения холеры.

Препараты первого ряда – основные препараты, к которым определяют чувствительность / устойчивость холерного вибриона при выделении возбудителя от больного: доксициклин, цiproфлоксацин (или офлоксацин, пефлоксацин), триметоприм / сульфаметоксазол (или триметоприм/сульфамонетоксин), фуразолидон, гентамицин, налидиксовая кислота. Включение налидиксовой кислоты в число препаратов первого ряда определяется рекомендациями ВОЗ в связи с тем, что резистентность к этому препарату (МПК ≥ 128 мг/л) может сопровождаться повышением значений МПК фторхинолонов в 10–40 раз и приводить к снижению их эффективности.

Препараты второго ряда, чувствительность / устойчивость к которым может служить целям дополнительного выбора препарата, одним из эпидемиологических маркеров для выявления источника, отслеживания путей распространения инфекции и контроля изменения антибиотикограммы возбудителя в ходе эпидемического процесса:

тетрациклин, левомицетин, ампициллин, стрептомицин, канамицин, рифампицин, цефтриаксон или цефотаксим.

Для МСР в плотной питательной среде выбирают серии двукратно увеличивающихся концентраций антибактериальных препаратов в соответствии с пограничными значениями МПК для чувствительных и устойчивых культур холерного вибриона на агаре Мюллера–Хинтона или агаре Хоттингера (табл. 5).

Таблица 5

Допустимые колебания значений МПК антибактериальных препаратов для контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *V. cholerae* не O1/не O139 KM 162

Анти- бактериальный препарат	Диапазон значений МПК, мг/л			
	агар Мюллера–Хинтона рН 7,3 ± 0,2		агар Хоттингера рН 7,2 ± 0,1	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. cholerae</i> не O1/ не O139 KM 162	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. cholerae</i> не O1/ не O139 KM 162
Доксициклин	0,5–2,0	0,25–1,0	0,5–2,0	0,25–1,0
Тетрациклин	0,5–2,0	0,5–1,0	0,5–2,0	0,5–1,0
Левомецетин	2–8	1–4	2–8	1–4
Налидиксовая кислота	1–4	1–4	1–4	0,5–2,0
Ципрофлоксацин	0,004–0,016	0,001–0,06	0,004–0,03	0,001–0,03
Рифампицин	4–16	1–4	4–16	1–4
Стрептомицин	4–8	4–8	2–8	4–8
Гентамицин	0,25–1,0	1–2	0,25–1,0	1–2
Канамицин	1–4	4–16	1–4	2–8
Ампициллин	2–8	2–8	2–8	2–8
Цефотаксим (цефтриаксон)	0,03–0,12	0,016–0,06	0,03–0,12	0,008–0,06
Фуразолидон	4–16	2–8	4–16	2–8
Триметоприм/ суль- фаметоксазол	0,5/9,5	1/19–2/38	0,5/9,5	1/19–2/38

Препараты первого ряда:

- доксициклин 1–2–4–8 мг/л;
- ципрофлоксацин
(или офлоксацин, пефлоксацин) 0,06–0,125–0,25–0,5–1 мг/л;
- налидиксовая кислота 2–4–8–16 мг/л;
- триметоприм/сульфаметоксазол
(или триметоприм/сульфамонетоксин) 1–2–4–8 мг/л (по три-
метоприму);
- фуразолидон 2–4–8–16 мг/л;
- гентамицин 2–4–8–16 мг/л.

Препараты второго ряда:

- тетрациклин 2–4–8–16 мг/л;
- левомицетин 2–4–8–16 мг/л;
- цефотаксим (или цефтриаксон) 0,5–1–2–4 мг/л;
- ампициллин 2–4–8–16 мг/л;
- стрептомицин 8–16–32–64 мг/л;
- канамицин 8–16–32–64 мг/л;
- рифампицин 2–4–8–16 мг/л.

Для постановки ДДМ используют проверенные коммерческие диски с определенными концентрациями антибактериальных препаратов.

Метод серийных разведений в агаре

Метод серийных разведений для оценки антибиотикочувствительности включает следующие этапы:

- приготовление растворов антибиотиков;
- приготовление питательных сред с антибиотиками;
- приготовление суспензии исследуемого микроорганизма;
- стандартизация и инокуляция;
- инкубация;
- учет и интерпретация результатов.

Приготовление растворов антибиотиков. Различают основные растворы антибиотиков – пригодные для хранения и рабочие – используемые «*ex tempore*» (тотчас же) для приготовления питательных сред. Для приготовления основных растворов антибиотиков предпочтительно использовать субстанции препаратов с известной активностью. Допускается использование готовых инъекционных лекарственных форм препаратов, оральные лекарственные формы не пригодны. Для приготовления навесок антибиотиков необходимо использовать аналитические весы или другие равного класса точности.

Основные растворы антибиотиков готовят в концентрации 1000,0 мкг/мл и выше. Навески антибиотиков для приготовления основных растворов готовят с учетом их активности.

Расчет навески антибактериального препарата (далее – АБП) для приготовления основного раствора проводят по формуле (1):

$$mAB_{\text{теор.}} = \frac{C \times V_{\text{теор.}}}{A} \quad (1),$$

где: $mAB_{\text{теор.}}$ – расчетная (теоретическая) навеска АБП, мг;
 C – необходимая концентрация АБП, мкг/мл;
 $V_{\text{теор.}}$ – объем растворителя для растворения теоретической навески, мл;
 A – активность АБП (количество активного вещества, содержащегося в субстанции), мкг/мл.

Взвесить точно расчетное количество порошка практически невозможно. Поэтому готовят близкую к расчетной навеску, а затем пересчитывают количество необходимого растворителя по формуле (2):

$$V_{\text{практ.}} = \frac{mAB_{\text{практ.}} \times V_{\text{теор.}} (\text{мл})}{mAB_{\text{теор.}} (\text{мг})} \quad (2),$$

где: $V_{\text{практ.}}$ – объем растворителя для растворения практической навески, мл;
 $mAB_{\text{практ.}}$ – полученная навеска АБП, мг;
 $mAB_{\text{теор.}}$ – расчетная (теоретическая) навеска АБП, мг;
 $V_{\text{теор.}}$ – объем растворителя для растворения теоретической навески, мл.

Различия в растворимости АБП определяют необходимость использования растворителей (солюбилизаторов) в минимальном объеме и необходимого количества разбавителя (дистиллированная вода). Для растворения тетрациклинов, рифампицина, фуразолидона используют димексид, левомицетин растворяют в 96° спирте. Приготовление основных растворов налидиксовой кислоты и фторхинолонов проводят в 1/2 от необходимого объема дистиллированной воды с добавлением по капле 0,1 М КОН до полного растворения препаратов с последующим доведением растворителя до расчетного объема. Растворителем и разбавителем для других АБП служит дистиллированная вода.

Приготовление питательных сред с антибиотиками. Рабочие растворы АБП готовят на дистиллированной воде в концентрациях, необходимых для внесения в расплавленный и остуженный (до 48–50 °С) агар (20 мл на одну чашку Петри) для получения в нем двукратно увеличивающихся концентраций препарата (например: 1–2–4–8–16–32 мг/л). В зависимости от необходимого количества чашек Петри с АБП каждой из концентраций используют мерные широкогорлые флаконы на 50–

100 мл, в которые наливают агар в объеме 20–40 мл и т.д. и добавляют раствор АБП (начиная с наименьшей концентрации), интенсивно размешивают и выливают в чашки Петри, на которых указана концентрация АБП. Контролем служит агаровая чашка без АБП. После застывания агара в чашках и их подсушивания на дне чашки делают надписи: дата посева, вид возбудителя, номер исследуемых культур.

Приготовление суспензии. Взвесь агаровых культур в концентрации 10^9 м.к./мл готовят в стерильном 0,85%-м растворе хлорида натрия. Концентрация вибрионов в суспензии для инокуляции должна быть 10^7 м.к./мл.

Испытуемые суспензии культур наносят на поверхность питательного агара без АБП (контроль) и с АБП (начиная с наименьшей концентрации) каплями легким касанием пипетки ($\sim 0,005$ мл) или с помощью штамп-репликатора ($\sim 0,001$ мл). Одновременно можно изучать до 25–50 культур, обязательно включая в качестве контрольных референс-штаммы, что подтверждает достоверность результатов антибиотикограммы.

После полного впитывания капель суспензий в агар чашки переворачивают вверх дном и инкубируют при 37°C в течение 18 ч.

Учет и интерпретация результатов. Учет результатов проводят после появления роста тестируемых культур на агаре без АБП и при условии, что значения МПК для контрольных штаммов укладываются в рекомендуемый диапазон значений этого показателя для испытуемых АБП. За МПК принимают концентрацию, вызвавшую полную ингибицию видимого роста. Для дифференцирования нежного роста от налета, оставшегося после инокулята, в ряде случаев целесообразно использовать увеличение.

При росте нескольких колоний или образовании «прозоны» исследование необходимо повторить, обратив особое внимание на чистоту культуры. В ряде случаев целесообразно получить субкультуру из единичных колоний, выросших на чашках с концентрацией антибиотика выше, чем явная МПК, и провести ее идентификацию.

Интерпретацию результатов проводят с учетом данных, приведенных в таблице 8, с отнесением штаммов к «чувствительным», «устойчивым» или «промежуточным».

Диско-диффузионный метод.

Постановка диско-диффузионного метода включает следующие этапы:

- приготовление питательных сред;
- приготовление суспензии микроорганизма и инокуляция;
- наложение дисков и инкубация;
- учет и интерпретация результатов.

Для получения достоверных результатов при постановке диско-диффузионного метода необходимо соблюдать правила хранения и использования коммерческих дисков. В противном случае содержание в них антибиотиков может упасть ниже допустимого уровня (прежде всего в результате увлажнения) еще до истечения срока годности. Диски должны храниться при температуре 4–8 °С плотно укупоренными. Для дополнительной гарантии защиты от увлажнения во флаконах коммерческих дисков содержится силикагель. Флаконы с дисками следует извлекать из холодильника за 1 ч до начала работы и выдерживать закрытыми при комнатной температуре, что обеспечит выравнивание температуры дисков и окружающей среды и, соответственно, предотвратит образование конденсата влаги после открывания флаконов.

Приготовление чашек с питательной средой. Плотную питательную среду готовят в соответствии с инструкцией изготовителя. Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливают на строго горизонтальную поверхность (выверенную по уровню, без впадин и выпуклостей). Глубина агарового слоя в чашке должна быть 4,0 мм, что достигается внесением 25–30 мл расплавленного агара в чашку диаметром 100 мм. Размер и форма зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Свежеприготовленные чашки перед инокуляцией культуры необходимо подсушить при 37 ± 1 °С в течение 10–20 мин с приоткрытой крышкой.

Чашки с агаром можно хранить в запаянных полиэтиленовых пакетах при 4–8 °С в течение 7–10 суток. Перед использованием их также необходимо подсушить в течение 10–20 мин при температуре 37 ± 1 °С с приоткрытой крышкой.

Перед инокуляцией необходимо проконтролировать отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

Приготовление суспензии и инокуляция. Суспензию микробных клеток в 0,9% изотоническом растворе хлорида натрия из 16–18 часовой агаровой культуры возбудителя, стандартизированную по оптическому отраслевому стандарту мутности бактериальных взвесей, калиброванному в международных единицах (МЕ) – 5 МЕ и с действующим сроком годности. Наносят на поверхность агара в объеме 0,2–0,3 мл ($\sim n \times 10^7$ КОЕ) и равномерно распределяют шпателем.

Наложение дисков и инкубация. Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с антибиотиками.

Диски наносят с помощью автоматического диспенсора или стерильным пинцетом. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть не менее 15–20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Непосредственно после наложения дисков чашки помещают в термостат кверху дном и инкубируют 14–18 ч при температуре 37 ± 1 °С. Увеличение интервала между нанесением дисков на поверхность среды и началом инкубации, а соответственно и пролиферации микроорганизма приводит к «преддиффузии» антибиотика и увеличению диаметра зоны ингибиции роста.

Учет результатов. После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете) (рис. 8). Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряют с точностью до 1 мм, при этом предпочтительнее пользоваться штангенциркулем или кронциркулем. При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на полную ингибицию видимого роста. Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и на едва заметный налет у края зоны. Крупные колонии, выявляемые в пределах четкой зоны ингибиции роста, свидетельствуют о наличии посторонней микрофлоры или о гетерорезистентности популяции. В этом случае необходима повторная идентификация и повторение исследования на антибиотикочувствительность.



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

При оценке чувствительности к сульфаниламидам и их комбинации с триметопримом границу зоны ингибиции роста следует учитывать на уровне ингибиции роста на 80 %. Это связано с тем, что под воздействием этих препаратов перед полной ингибицией роста возможно завершение 1–2 циклов пролиферации микроорганизма.

Критерии оценки чувствительности/устойчивости холерного вибриона к антибактериальным препаратам. Интерпретацию результатов по определению чувствительности культур холерного вибриона проводят в соответствии с пограничными значениями МПК и диаметрами зон подавления роста возбудителя, с учетом диапазона значений для 50 антибиотикочувствительных штаммов *V. cholerae* classical и El Tor *in vitro*.

В таблице 6 даны пограничные значения МПК и диаметров зон подавления роста для чувствительных и устойчивых культур на агаре Мюллера–Хинтона, агаре Хоттингера и для ДДМ – дополнительно на АГВ. Между этимипоказателями находятся значения для культур с промежуточной устойчивостью. Необходимо учитывать также результаты определения МПК и диаметры зон подавления роста для контрольных штаммов на используемой серии питательной среды.

Таблица 6

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп: пограничные значения диаметров зон подавления роста и МПК антибактериальных препаратов

Анти- бактериальный препарат	Содер- жание в диске, мкг	Диаметр зон пода- вления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
Доксициклин	10	≥ 19	≤ 17	≤ 2,0	≥ 4,0
Тетрациклин	30	≥ 19	≤ 17	≤ 4,0	≥ 8,0
Левомецетин	30	≥ 23	≤ 19	≤ 4,0	≥ 16,0
Налидиксовая кислота	30	≥ 20	≤ 18	≤ 4,0	≥ 16,0
Ципрофлоксацин	5	≥ 25	≤ 19	≤ 0,1	≥ 1,0
Рифампицин	5	≥ 20	≤ 13	≤ 4,0	≥ 16,0
Стрептомицин	30	≥ 15	≤ 12	≤ 16,0	≥ 32,0
Гентамицин	10	≥ 16	≤ 12	≤ 4,0	≥ 8,0
Канамицин	30	≥ 17	≤ 15	≤ 16,0	≥ 32,0

Ампициллин	10	≥ 17	≤ 13	≤ 4,0	≥ 16,0
Цефотаксим	30	≥ 25	≤ 15	≤ 1,0	≥ 4,0
Цефтриаксон	30	≥ 25	≤ 15	≤ 1,0	≥ 4,0
Фуразолидон	300	≥ 18	≤ 15	≤ 4,0	≥ 16,0
Триметоприм/ сульфаметоксазол	1,25/ 23,75	≥ 20	≤ 15	≤ 2,0/38,0	≥ 8,0/152,0

4.6.8. Определение видовой принадлежности исследуемой культуры с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа

Для исследования используются 18–24 часовые культуры исследуемого микроорганизма, выращенные на щелочном агаре (рН 7,6). Предварительно культуру проверяют в ориентировочной слайд-агглютинации с холерными сыворотками O1, PO и O139. Культуры, агглютинирующиеся одной из серогруппспецифических сывороток, исследуют масс-спектрометрически с предварительной экстракцией белка, не агглютинирующиеся – прямым нанесением на MSP-чип.

Прямое нанесение образцов на MSP-чип

Одну изолированную колонию возбудителя снимают одноразовой микробиологической петлей и равномерно наносят на лунку MSP-чипа, не выходя за края. Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) используют 5 лунок для получения достоверного результата. Сразу после высыхания нанесенной на чип биомассы сверху наносят 1 мкл матрицы. В лунку H12 MSP-чипа вносят 1 мкл калибровочного стандарта для масс-спектрометрии, на который также после высыхания наносят 1 мкл матрицы. Необходимо дождаться высыхания раствора матрицы, после чего можно приступать к масс-спектрометрическим исследованиям.

Экстракция белков:

1. Готовят и маркируют необходимое число микропробирок, соответствующее числу исследуемых штаммов.
2. В каждую пробирку вносят 300 мкл деионизованной воды.
3. Микробиологической петлей диаметром 1 мм в пробирку вносят одну изолированную колонию возбудителя, аккуратными, плавными движениями тщательно суспендируют.
4. К суспензии добавляют 900 мкл 96%-го этилового спирта.
5. Полученную смесь тщательно перемешивают на микроцентрифуге-вортексе.
6. После перемешивания пробирки помещают в центрифугу (необходимо сохранять ориентацию пробирок после помещения их в ротор) и центрифугируют в течение 2 минут при 13 тыс. об/мин.

7. Полученный супернатант аккуратно, не задевая осадка, отбирают одноразовым наконечником и сливают в емкость с дезинфицирующим раствором.

8. Этапы 6 и 7 повторяют для удаления остатков раствора этанола.

9. К осадку добавляют 50 мкл 70%-го водного раствора муравьиной кислоты, полученную смесь тщательно перемешивают пипетированием или на микроцентрифуге-вортексе.

10. К суспензии добавляют равный объем ацетонитрила и смесь повторно тщательно перемешивают.

11. После перемешивания пробирки помещают в центрифугу (необходимо сохранять ориентацию пробирок, после помещения их в ротор) и центрифугируют в течение 2 минут при 13 тыс. об/мин.

12. 1 мкл полученного супернатанта наносят в лунку MSP-чипа. Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) используют 5 лунок для получения достоверного результата.

13. Сразу после высыхания нанесенной на чип капли супернатанта сверху наносят 1 мкл матрицы.

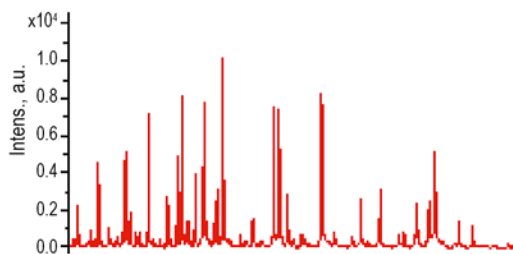
14. В лунку H12 MSP-чипа вносят 1 мкл калибровочного стандарта для масс-спектрометрии, на который также после высыхания наносят 1 мкл матрицы. Необходимо дождаться высыхания раствора матрицы, после чего можно приступать к масс-спектрометрическим исследованиям.

Проведение MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа

Идентификацию проводят на масс-спектрометре Microflex™. На первом этапе идентификации программа Flex Control производит сбор исходных спектров исследуемых образцов. Для получения одиночного масс-спектра используют 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составляет 2000–20000 Да (рис. 9).



а



б

Рис. 9. Масс-спектрометр Microflex™ (а) и образец масс-спектра, полученного при идентификации культуры *V. cholerae* (б).

С каждой лунки чипа снимается исходный спектр, представляющий собой сумму шести одиночных спектров (240 импульсов лазера). Для получения достоверных результатов идентификации с каждого образца необходимо получить не менее пяти исходных спектров.

Учет и интерпретация результатов

С помощью программы «MALDI Biotyper 3.0 RTC» проводится автоматическая идентификация, на основании сравнения собранных спектров с референсными спектрами базы данных. По окончании процесса идентификации, программа отображает результат идентификации, приводя наиболее ревалентную исходному спектру таксономическую единицу базы данных, с указанием значения коэффициента соответствия. Чем выше коэффициент соответствия, тем вероятнее идентификация вида.

После завершения процесса идентификации результат выводится в таблицу классификации, показывающую наилучший результат идентификации полученных спектров. Достоверность полученных результатов характеризуется значением Score и соответствующим цветовым, символьным и буквенным обозначением.

Диапазон Score	Описание	Символы	Цвет
2.300–3.000	Высокий уровень видовой идентификации	(+++)	Зеленый
2.000–2.299	Надежная родовая идентификация, возможная видовая идентификация	(++)	Зеленый
1.700–1.999	Возможная родовая идентификация	(+)	Желтый
0.000–1.699	Надежная идентификация	(–)	Красный

4.6.9. Биохимическая идентификация исследуемой культуры с использованием тест-системы «Bio Merieux» (Франция)

Для биохимической идентификации энтеробактерий и других грамотрицательных палочек используется тест-система API 20E «Bio Merieux» (Франция), основанная на принципе «субстрат в питательной среде». Состоит из прозрачной полимерной пластинки с 20 микропробирками объемом 0,25 мл, содержащими дегидратированные субстраты для определения 20 тестов: β-галактозидазы, аргининди- гидролазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, уреазы, триптофандезаминазы, желатиназы; образования индола, сероводорода, ацетоина; ферментации цитрата, глюкозы, маннитола, инозитола, сорбитола, амигдалина, рамнозы, сахарозы, мелецитозы, арабинозы. Дополнительно вне панели определяют цитохромоксидазу, окисление и ферментацию глюкозы, подвижность. В состав комплекта входят так-

же реактивы для определения индола, триптофандезаминазы, ацетона, нитритов, оксидазы.

Порядок исследования

Для исследования берут изолированную колонию со среды первичного посева, ставят пробу на оксидазу, готовят из колонии суспензию бактерий определенной мутности по шкале Мак-Фарланда. Вносят во все микропробирки по 100 мкл суспензии бактерий, затем добавляют по 50 мкл вазелинового масла в микропробирки с тестами на уреазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, аргининдигидролазу, сероводорода. Посевы инкубируют при 36 °С в течение 18–24 ч, после чего добавляют реактивы на ацетонин, индол, триптофандезаминазу, нитриты.

Учет результатов

Результаты учитывают визуально, заполняют бланки с кодами цифрового профиля (рис. 10). Идентификацию проводят по кодам или идентификационной таблице. Если на панели нет ферментации глюкозы и менее двух положительных прочих тестов, ставят ОФ тест, определяют подвижность и продлевают наблюдение еще 24 ч для выявления неферментирующих бактерий.



Рис. 10. Тест-система API 20E «Bio Merieux» (Франция).

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ И РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.
2. МР 4.2.0089-14 Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности.
3. МУ 3.3.2.2124-06 Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. – М., 2007.
4. МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. – М., 2009.
5. МУ 3.1.1.2232-07 Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры. – М., 2007.
6. МУК 4.2.3745-22 Методы лабораторной диагностики холеры.
7. МУК 4.2.3746-22 Организация и проведение лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного уровня.
8. МУК 4.2.2495-09 Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам.
9. Адамов А.К., Наумшина М.С. Холерные вибрионы / Саратов: Изд-во ун-та, 1984. – 328 с.
10. Актуальные проблемы холеры / Под ред. В.И. Покровского, Г.Г. Онищенко. – Серия: Вопросы практической эпидемиологии. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000. – 283 с.
11. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, Шико, 2009. – 472 с.
12. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги. – РнД., 1990. – 159 с.
13. Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штам-

мов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL». – М., 2012.

14. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов / Под ред. В.Н. Милютин. – РнД., 1981. – 175 с.

15. 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. – 380 с.

16. Покровский В.И., Малеев В.В. Холера: Библиотека практического врача. – Л., 1978. – 232 с.

17. Холера в СССР в период VII пандемии / Под ред. В.И. Покровского. – М.: Медицина, 2000. – 471 с.

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

**Учебное пособие
для врачей-бактериологов (биологов)
и преподавателей**

Корректор *Булкина С.В.*
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*
Художник *Фалеев К.А.*

Сдано в набор 22.06.2022. Подписано в печать ##.09.2022. Бумага офсетная.
Формат 60x84¹/₁₆. Гарнитура Cambria.
Усл. печ. л. 5,35. Тираж 130 экз. Заказ № 043-22.

ИНЦХТ
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.
E-mail: arleon58@gmail.com

УЧЕБНЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ (БИОЛОГОВ) И ПРЕПОДАВАТЕЛЕЙ



ISBN 978-5-98277-368-5



9 785982 773685