Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

3.1.2. ИНФЕКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Диагностика коклюша и паракоклюша

Методические рекомендации
МР 3.1.2.0072—13

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.9
Д44

Д44 **Диагностика** коклюша и паракоклюша: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—56 с.

1. Разработаны: Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова, Н. А. Кошкина); Федеральным бюджетным учреждением науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» (Г. Я. Ценева, Н. Н. Курова); Федеральным бюджетным учреждением науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (С. Б. Яцышина, Т. С. Селезнева, М. Н. Прадед); Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства» (Ю. В. Лобзин, И. В. Бабаченко).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 24 мая 2013 г.

3. Введены в действие с момента утверждения.

ББК 51.9

Редакторы Н. В. Кожока, Н. Е. Акопова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 25.06.13

Формат 60x88/16 Печ. л. 3,5

Тираж 200 экз. Заказ 27

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 8(495)952-50-89

© Роспотребнадзор, 2013
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013

Содержание

Термины и сокращения ... 4
1. Область применения ... 5
2. Введение ... 6
3. Характеристика рода *Bordetella*, биологические свойства возбудителей коклюша и паракоклюша ... 7
4. Показания к обследованию ... 11
4.1. Показания к обследованию на коклюш в предсудорожном периоде ... 12
4.2. Показания к обследованию на коклюш в периоде судорожного кашля ... 13
4.3. Особенности диагностики коклюша у пациентов разного возраста, с разным вакцинальным статусом ... 15
5. Лабораторная диагностика ... 16
5.1. Критерии лабораторного подтверждения диагноза ... 17
5.2. Сроки обследования ... 17
5.3. Оформление направления материала на исследование ... 18
6. Бактериологическое исследование ... 19
6.1. Взятие материала ... 19
6.2. Доставка материала ... 21
6.3. Ход исследования ... 21
6.4. Материалы и оборудование ... 27
7. Полимеразная цепная реакция ... 28
7.1. Взятие материала ... 29
7.2. Доставка и хранение материала ... 31
7.3. Проведение исследования ... 31
7.4. Материалы и оборудование ... 33
8. Серологические методы исследования ... 37
8.1. Взятие материала ... 38
8.2. Доставка и хранение материала ... 39
8.3. Реакция агглютинации ... 39
8.4. Иммуноферментный анализ ... 40
8.5. Иммуноблот ... 41
9. Нормативно-методические ссылки ... 42
Приложение 1. Алгоритм выбора метода лабораторной диагностики ... 44
Приложение 2. Приготовление и стерилизация тампонов ... 45
Приложение 3. Приготовление питательных сред с добавками ... 46
Приложение 4. Определение содержания аминного азота ... 48
Приложение 5. Проверка качества казеиново-угольного агара ... 50
Приложение 6. Приготовление сред и реактивов для биохимической идентификации бордетелл ... 52
Приложение 7. Хранение культур бордетелл ... 53
Приложение 8. Журнал по бактериологической диагностике коклюша ... 55
Приложение 9. Методика проведения смывов с целью контроля контаминации лаборатории продуктами ПЦР ... 56

Термины и сокращения

АКДС – адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГОСТ – Государственный стандарт

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

КУА – казеиново-угольный агар

МЕ – международные единицы

МУ – методические указания

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ПСК – период судорожного кашля

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – реакция агглютинации

РИФ – реакция иммунофлуоресценции

РНК – рибонуклеиновая кислота

СанПиН – санитарно-эпидемиологические правила и нормы

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СП – санитарно-эпидемиологические правила

ТЕ – буфер Трис-ЭДТА

ТУ – технические условия

ФС – фармакопейная статья

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (разновидность ИФА)

Ig – иммуноглобулин

IL – интерлейкин

FHA – filamentous haemagglutinin (филаментозный гемагглютинин)

NASBA – nucleic acid sequence-based amplification (метод амплификации РНК)

PT – pertussis toxin (коклюшный токсин)

RS-инфекция – инфекция, вызванная респираторно-синцитиальным вирусом

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

24 мая 2013 г.
Дата введения: с момента утверждения

3.1.2. ИНФЕКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Диагностика коклюша и паракоклюша

Методические рекомендации
МР 3.1.2.0072—13

1. Область применения

В методических рекомендациях представлена современная микробиологическая характеристика коклюша в условиях массовой вакцинопрофилактики. В них содержится краткое описание рода *Bordetella,* включая новые виды, открытые в последнее десятилетие, более детальная характеристика биологических свойств *B. pertussis, B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*, описание бактериологического метода исследования с использованием приемов, повышающих его информативность, современных методов лабораторной диагностики: ПЦР и ИФА. Представлены алгоритмы диагностики коклюша в зависимости от вакцинального статуса, возраста и сроков заболевания пациентов. Цель настоящих методических рекомендаций – унифицировать подходы к лабораторной диагностике коклюшной инфекции.

Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Роспотребнадзора (микробиологов, эпидемиологов), специалистов по клинической лабораторной диагностике, инфекционистов, педиатров, семейных врачей и врачей общей практики.

2. Введение

В довакцинальную эру коклюш занимал второе место среди детских капельных инфекций по уровню заболеваемости и первое по уровню смертности. В настоящее время в мире ежегодно заболевает несколько миллионов человек, умирает около 200 тыс. (в 2008 г. – 16 млн заболевших, 195 тыс. смертей).

Специфическая профилактика коклюша, проводимая в нашей стране с 1959 года, отчетливо повлияла на эпидемический процесс, биологические свойства возбудителя и клинику. Этапы массовой иммунизации характеризовались различным уровнем охвата детей прививками против коклюша и, в соответствии с этим, менялась эпидемиологическая обстановка. Низкий уровень иммунизации в 90-е годы привел к росту заболеваемости коклюшем. Достижение охвата прививками детей первого года жизни (более 95 %) в последующие годы и поддержание его на этом уровне обеспечило не только снижение заболеваемости коклюшем, но и с 2001 г. стабилизацию показателей на минимальном уровне (3,2—5,7 на 100 тыс. населения). Особенностью эпидемического процесса коклюша на фоне высокого охвата прививками детей раннего возраста является возникновение периодических подъемов. Это объясняется недостаточной напряженностью и длительностью поствакцинального иммунитета, создаваемого в условиях нередкого нарушения календаря прививок, в частности, несоблюдения сроков вакцинации и интервалов между введениями доз вакцины и проведением ревакцинации, что способствует накоплению значительного числа неиммунных лиц. Увеличение охвата прививками привело в настоящее время к изменению возрастной структуры лиц, заболевших коклюшем. Большинство заболевших составляют школьники 7—14 лет – до 50,0 %, дети 3—6 лет – до 25,0 %, наименьшую долю – дети в возрасте 1—2 лет – 11,0 % и дети до 1 года – 14,0 %. В периоды подъема заболеваемости коклюшем интенсивность эпидемического процесса определяется заболеваемостью детей школьного возраста. Темпы роста в этой группе увеличиваются в 2—3 раза. Из числа лиц, заболевших коклюшем, 65,0 % составляют привитые.

Поствакцинальный иммунитет не предохраняет от заболевания. Коклюш в этих случаях протекает в виде легких и стертых форм инфекции, которые диагностируются, в основном, ретроспективно (серологически). После перенесенного заболевания остается более длительный иммунитет.

Истинная заболеваемость коклюшем значительно выше за счет недиагностированной коклюшной инфекции (легких и стертых клиничес-

ких форм). Трудности клинической диагностики коклюша на ранних стадиях заболевания, отсутствие обследования всех длительно (свыше 7 дней) кашляющих или его проведение на поздних сроках заболевания, а также после продолжительного лечения антибактериальными препаратами приводит к низкому проценту выявляемости возбудителя инфекции. Уровень бактериологического подтверждения диагноза составляет 10—20 %. Современные методы исследования позволяют проводить раннюю диагностику заболевания (ПЦР) и существенно облегчают постановку диагноза (ПЦР, ИФА).

Таким образом, коклюш в нашей стране требует пристального внимания со стороны врачей различных специальностей. Своевременная и качественная лабораторная диагностика коклюшной инфекции позволит избежать ошибок в постановке диагноза и будет способствовать эффективной терапии.

3. Характеристика рода *Bordetella*, биологические свойства возбудителей коклюша и паракоклюша

Род Bordetella относится к семейству Alcaligenaceae и включает 9 видов: *B. ansorpii*, *B. avium*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *B. petrii*, *B. trematum*. Первой (в 1908 г.) была описана *B. pertussis*, бактерия патогенна для человека и является возбудителем коклюша. *B. parapertussis* была описана в 1938 г., вызывает у людей паракоклюш (коклюшеподобное заболевание), она также была выделена от овец. *B. bronchiseptic*а была описана в 1911 г., является возбудителем заболеваний дыхательных путей у многих млекопитающих (кашля у собак, атрофического ринита у свиней и др.), но встречается также бессимптомное носительство. У человека редко вызывает заболевание, однако описаны случаи, когда у пожилых людей, заразившихся от домашних животных (кроликов), *B. bronchiseptica* вызывала длительный кашель. *B. avium* описана в 1984 г., является возбудителем ринотрахеита у птиц. Описано несколько случаев выделения *B. avium* от пожилых пациентов с отягощенным анамнезом, с клинической картиной пневмонии. В 1995 г. были описаны сразу два новых вида: *B. hinzii* и *B. holmesii*. *B. hinzii* колонизирует дыхательные пути домашней птицы, была выделена от иммуноскомпрометированных пациентов, описан случай летальной септицемии. *B. holmesii* выделялась только от людей, обнаруживалась в мокроте, несколько раз в крови, этиологическая роль в развитии инфекций не доказана. В 1996 г. выделена *B. trematum*, возбудитель вызывает раневые и ушные инфекции. В 2001 г. была описана *B. petrii*, единственный представитель рода, выделенный из окружаю-

щей среды и способный жить в анаэробных условиях. В 2005 г. была выделена *B. ansorpii*, описано несколько случаев выделения от пациентов с онкологическими заболеваниями (из гнойного содержимого эпидермальной кисты, из крови).

Морфологические и культуральные свойства

Бактерии рода *Bordetellae* – мелкие (0,2—0,5 мкм × 0,5—2,0 мкм) грамотрицательные коккобациллы. В мазках – часто биполярно окрашенные, одиночные или в парах, реже в цепочках, имеют нежную капсулу. Все, за исключением *B. petrii*, – строгие аэробы. Температура выращивания бордетелл 35—37 °С (оптимально 35 °С). Бордетеллы требовательны к условиям роста: 130—150 мг % аминного азота, кровь, дрожжевой экстракт, никотиновая кислота, аминокислоты (цистин, пролин, метионин, серин, глютамин и др.); наиболее требователен возбудитель коклюша, он растет только на специальных средах, в то время как остальные представители рода растут на кровяном агаре. Классической средой для первичного выделения *B. pertussis* является среда Борде-Жангу (картофельно-глицериновый агар), позднее были предложены синтетические и полусинтетические среды, в частности, казеиново-угольный агар (КУА). На указанных средах бордетеллы вырастают в виде характерных колоний: на среде Борде-Жангу – выпуклые, гладкие, блестящие, серебряного цвета, напоминающие капли ртути, окруженные зоной гемолиза; на КУА – выпуклые, гладкие, серого цвета с жемчужным, желтоватым или беловатым оттенком. Колонии маслянистые, легко снимаются петлей. *B. parapertussis* и *B. holmesii* за счет образования пигмента вызывают потемнение сред с кровью, образуют бурую подложку.

Таблица 1

Ростовые характеристики основных видов бордетелл

	B. pertussis	*B. parapertussis*	*B. bronchiseptica*
Время, необходимое для появления колоний (сут.):			
– на КУА (бордетелагар)	2—3	1—2	18—24 ч
– на среде Борде–Жангу	3—6	2—3	1—2
Размер колоний на КУА	1—2 мм	2—3 мм	4 мм
Рост на простом агаре	–	+	+

Устойчивость: возбудители коклюша и паракоклюша – облигатные паразиты, нестойкие. Погибают при прогревании до 50 °С за

30 мин, при обработке дезинфицирующими растворами. Во внешней среде не сохраняются. Устойчивы ко многим антибиотикам.

Биохимические свойства

Основные биохимические свойства бордетелл, которые используются в практической работе при изучении выделенных культур, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Дифференцирующие признаки видов рода *Bordetella*

	Рост на кровяном агаре	Оксидаза	Уреаза	Тирозиназа	Восстановление нитратов	Утилизация цитратов	Подвижность
B. pertussis	–	+	–	–	–	–	–
B. parapertussis	+	–	+	+	–	–	–
B. bronchiseptica	+	+	+*	–	+	+	+
B. avium	+	+	–	–	–	+	+
B. hinzii	+	+	±	–	–	+	+
B. holmesii	+	–	–	+	–	–	–
B. trematum	+	–	–	–	±	–	+
B. petrii	+	+	–	–	–	+	–
B. ansorpii	+	–	–	–	–	+	+
* – через 4 часа							

B. pertussis наименее активна ферментативно (положительный тест на оксидазу). *B. parapertussis* вырабатывает ферменты тирозиназу и уреазу и не образует оксидазы. Тирозиназа катализирует продукцию пигментов из тирозина, содержащегося в питательных средах, что вызывает их потемнение. Наиболее активна *B. bronchiseptica*: вырабатывает уреазу, оксидазу, утилизирует цитраты, восстанавливает нитраты до нитритов.

Антигенное строение и серологическая характеристика

К факторам патогенности *B. pertussis* в первую очередь относят ***коклюшный токсин***. Это экзотоксин, белок с молекулярной массой 117 000 Да, состоящий из двух функциональных частей (А и В) и пяти структурных субъединиц (S1—S5): фрагмент А (соответствует субъединице S1) – обладает ферментативной активностью, ингибирует клеточную аденилатциклазу. Участок В (состоит из субъединиц S2—S5) отвечает за присоединение токсина к рецепторам клеток-мишеней. Токсин обладает высокой иммуногенностью, в инактивированной форме вклю-

чен в состав всех бесклеточных коклюшных вакцин. Определение антител к коклюшному токсину методом ИФА применяется для диагностики коклюша и контроля эффективности вакцинации.

Филаментозный гемагглютинин – поверхностный белок, участвующий в адгезии, обладает протективными свойствами. Включен в состав бесклеточных коклюшных вакцин. В ряде коммерческих ИФА-тест-систем для диагностики коклюша предлагается определять уровень антител различных классов к антигенному комплексу, в состав которого входят гемагглютинин и коклюшный токсин. В отличие от токсина, гемагглютинин не является строго специфичным для *B. pertussis*, присутствует также у *B. parapertussis*, может давать перекрестные реакции с *H. influenzae*, *C. pneumoniae* и рядом других бактерий.

Пертактин – белок наружной мембраны, относится к системе адгезинов, продуцируемых бактериями при попадании в человеческий организм. Обладает протективными свойствами, входит в состав ряда бесклеточных коклюшных вакцин.

Аденилатциклаза-гемолизин – это комплекс экзофермента аденилатциклазы, которая при попадании в клетки катализирует образование цАМФ, с токсином – гемолизином. Токсин – основной фактор патогенности, действующий на начальном этапе инфекции, кроме того, с ним связывают протективные свойства комплекса.

Агглютиногены – поверхностные белки, ответственные за выработку агглютинирующих антител. У бордетелл выделено 16 агглютиногенов (табл. 3).

Таблица 3

Агглютиногены бордетелл

	Общеродовой	Видовые	Внутривидовые (штаммовые)
B. pertussis	7	1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 16
B. parapertussis		14	8, 9, 10
B. bronchiseptica		12	8, 9, 10, 11

В зависимости от наличия в бактериальной клетке агглютиногенов 2 и 3 выделяют четыре серотипа *B. pertussis*: 1.2.0; 1.0.3; 1.2.3; 1.0.0. Понятие об агглютиногенах тесно связано с фимбриями (Fim). В геноме всех *B. pertussis* присутствуют гены *fim*2 и *fim*3, то есть теоретически любой штамм может продуцировать агглютиногены 2 и/или 3. Фимбрии включены в состав некоторых бесклеточных коклюшных вакцин. Серотипирование *B. pertussis* в отечественной практике основано на агглютинации бактериальных клеток монофакторными сыворотками, т. е. ан-

тителами к агглютиногенам, в реакции агглютинации (РА) на стекле, а в зарубежной практике – на агглютинации бактериальных клеток моноклональными антителами к фимбриальным антигенам в реакции агглютинации в микропланшете. Для диагностики коклюша в России до настоящего времени используется РА с цельноклеточным диагностикумом, в которой определяются агглютинирующие антитела, в первую очередь, к агглютиногенам:

• ***липополисахарид***: в его состав входят два липида: А и Х. С Х-фракцией связана биологическая активность липополисахарида. Он обладает множественными функциями, в том числе выраженной иммуногенностью; с ним связывают реактогенность клеточной вакцины;

• ***трахеальный цитотоксин*** – фрагмент пептидогликана клеточной стенки. Обладает разнообразными биологическими свойствами: пирогенность, адъювантность, артритогенность, стимуляция продукции IL-1. *In vitro* токсин поражает трахеальные эпителиальные клетки и вызывает цилиостаз. При этом нарушается мукоцилиарный клиренс – первая линия защиты, и создаются условия для персистирования инфекции;

• ***дермонекротизирующий токсин*** обладает вазоконстрикторной активностью, у экспериментальных животных вызывает снижение прироста массы тела, атрофию селезенки, ишемические повреждения или некроз кожи. Его роль в заболевании не ясна.

Все вышеперечисленные факторы присутствуют у свежевыделенных штаммов коклюшного микроба. Однако при хранении на искусственных питательных средах проявляется изменчивость возбудителя. Установлено, что в процессе сапрофитизации коклюшный микроб проходит четыре фазы: свежевыделенный микроб (гладкий штамм), обладающий высокими вирулентными и иммуногенными свойствами, относится к первой фазе. По мере перехода к четвертой фазе постепенно утрачивается иммуногенность, вирулентность, меняются культурально-биологические свойства.

4. Показания к обследованию

Коклюш – заболевание, продолжающееся минимум две недели, без явлений интоксикации и повышения температуры тела, протекающее с приступообразным кашлем, усиливающимся ночью и по утрам, сопровождающимся покраснением лица, шумными вдохами (репризами), заканчивающимся отхождением вязкой слизи или рвотой в конце приступа кашля.

Лабораторно подтвержденный случай (см. п. 5.1).

Эпидемиологически связанный случай: случай, при котором пациент имел (имеет) контакт с одним и более больными коклюшем при условии, что хотя бы один случай в цепи передач был подтвержден лабораторно.

Вероятный случай: отвечает клиническому определению случая, лабораторно не подтвержден и не имеет эпидемиологической связи с лабораторно подтвержденным случаем.

Подтвержденный случай: отвечает клиническому определению случая, лабораторно подтвержден и/или имеет эпидемиологическую связь с лабораторно подтвержденным случаем.

Заболевание протекает циклично со сменой ряда периодов.

Инкубационный период продолжается от 3 до 14 дней (в среднем 7—8 дней).

Предсудорожный период – от 3 до 14 дней, проявляется сухим навязчивым кашлем на фоне нормальной температуры тела.

Период судорожного кашля (ПСК) – от 2—3 до 6—8 недель и более, характеризуется типичными приступами судорожного кашля, часто сопровождаемого репризами и отхождением мокроты или рвотой после кашля.

Период обратного развития (ранней реконвалесценции) – от 2 до 8 недель, на фоне улучшения самочувствия ребенка кашель становится реже и постепенно теряет типичный характер.

Период реконвалесценции (поздней) – от 2 до 6 месяцев, характеризуется состоянием гиперреактивности с возможным развитием приступообразного кашля при интеркуррентных заболеваниях или эмоциональных нагрузках.

4.1. Показания к обследованию на коклюш в предсудорожном периоде

В предсудорожном периоде обязательно лабораторное подтверждение диагноза методами выявления возбудителя (бактериологическим, ПЦР).

Опорно-диагностические признаки коклюша в предсудорожном периоде:

- контакт с больным коклюшем или длительно кашляющим ребенком (взрослым) в семье или детском учреждении;
- постепенное начало при удовлетворительном состоянии и хорошем самочувствии больного;
- нормальная температура тела;
- сухой навязчивый постепенно усиливающийся кашель;

• отсутствие или слабая выраженность других катаральных явлений, кроме кашля;

• отсутствие патологических аускультативных и перкуторных изменений в легких;

• отсутствие эффекта от проводимой симптоматической терапии;

• появление типичных гематологических изменений – лейкоцитоза с лимфоцитозом (или изолированного лимфоцитоза) при нормальной СОЭ.

4.2. Показания к обследованию на коклюш в периоде судорожного кашля

Диагноз ставится на основании клинико-эпидемиологических и гематологических данных, подтверждается лабораторными методами выявления возбудителя и/или специфических антител.

Основным симптомом этого периода является приступообразный судорожный (спазматический) кашель. Приступ кашля представляет следующие друг за другом дыхательные толчки на выдохе, прерываемые свистящим судорожным вдохом – репризом, возникающим при прохождении воздуха через суженную (вследствие ларингоспазма) голосовую щель. Заканчивается приступ отхождением вязкой, стекловидной мокроты или рвотой. Приступу может предшествовать аура (чувство страха, беспокойство, чихание, першение в горле и др.). Приступы кашля могут быть кратковременными или продолжаться 2—4 мин. Возможны пароксизмы – концентрация приступов кашля на коротком отрезке времени. При типичном приступе кашля характерен вид больного: лицо краснеет, затем синеет, становится напряженным, набухают кожные вены шеи, лица, головы; отмечается слезотечение. Язык высовывается из ротовой полости до предела, кончик его поднимается кверху. В результате трения уздечки языка о зубы и ее механического перерастяжения происходит надрыв или образование язвочки. Надрыв или язвочка уздечки языка – патогномоничный симптом коклюша. При гладком течении заболевания температура тела остается нормальной.

Характерно постепенное развитие симптомов заболевания с максимальным учащением и утяжелением приступов судорожного кашля на 2 неделе ПСК; присоединением специфических осложнений на 3 неделе, неспецифических осложнений на фоне развития вторичного иммунодефицитного состояния – на 4 неделе ПСК.

Опорно-диагностические признаки коклюша в периоде судорожного кашля:

• характерный эпидемиологический анамнез;

• приступообразный *судорожный* кашель – патогномоничный симптом;

• характерная динамика кашля от сухого навязчивого до приступообразного судорожного;

• характерный внешний вид больного (пастозность век, одутловатость лица);

• нормальная температура тела при гладком течении заболевания;

• обилие крупно- и среднепузырчатых влажных хрипов в легких, уменьшающихся или исчезающих после приступа кашля;

• возможны надрыв или язвочка уздечки языка – патогномоничный симптом.

Критерии тяжести коклюша:

• выраженность симптомов кислородной недостаточности (гипоксии);

• частота и характер приступов судорожного кашля;

• наличие рвоты после судорожного кашля;

• состояние ребенка в межприступном периоде;

• выраженность отечного синдрома;

• наличие и сроки развития специфических осложнений;

• выраженность гематологических изменений.

Таблица 4

Характеристика коклюша по формам тяжести

Признаки	Форма тяжести		
	легкая	среднетяжелая	тяжелая
гипоксия	нет	цианоз носогубного треугольника	цианоз лица
длительность предсудорожного периода	7—14 дней	7—10 дней	3—5 дней
частота приступов	до 10 в сутки; репризы редко	10—20 в сутки; репризы часто	более 20 в сутки; пароксизмы
рвота после кашля	нет	характерна	возможна
состояние	активный, аппетит сохранен	активный, аппетит снижен	вялый, аппетит отсутствует
осложнения	нет	на 3—4-й неделях	с 1 недели
лейкоцитоз	10—15 × 10^9 кл/л	до 20—30 × 10^9 кл/л	более 40 × 10^9 кл/л
лимфоцитоз	до 70 %	70—80 %	более 80 %

Осложнения коклюша

Специфические: эмфизема легких, эмфизема средостения и подкожной клетчатки, ателектазы, коклюшная пневмония, нарушения ритма дыхания (задержки дыхания – до 30 с; остановки – апноэ – более 30 с), нарушение мозгового кровообращения, кровотечения (из носа, заднеглоточного пространства, бронхов, наружного слухового прохода), кровоизлияния (в кожу и слизистые оболочки, склеру и сетчатку глаз, головной и спинной мозг), грыжи (пупочная, паховая), выпадение слизистой оболочки прямой кишки, разрывы барабанной перепонки и диафрагмы.

Неспецифические осложнения обусловлены наслоением вторичной бактериальной флоры (пневмония, бронхит, ангина, лимфаденит, отит и др.).

Резидуальные явления: хронические бронхолегочные заболевания (хронический бронхит, бронхоэктатическая болезнь); задержка психомоторного развития, неврозы, судорожный синдром, различные речевые расстройства; энурез; редко – слепота, глухота, парезы, параличи.

4.3. Особенности диагностики коклюша у пациентов разного возраста, с разным вакцинальным статусом

Атипичные формы коклюша

• Абортивная – период судорожного кашля начинается типично, но заканчивается в течение недели.

• Стертая – сухой, навязчивый кашель сохраняется весь период заболевания.

• Бессимптомная (субклиническая) – клинических симптомов нет, но есть высев и/или нарастание титров специфических антител.

Особенности коклюша у детей раннего возраста

• Преобладают тяжелые и среднетяжелые формы, возможны летальные исходы.

• Инкубационный и катаральный периоды укорочены.

• Период судорожного кашля увеличивается до 6—8 недель.

• У новорождённых детей бывают эквиваленты приступов кашля.

• Кашель может быть малозвучным, с цианозом лица.

• Мокроты выделяется меньше, она может выделяться из носа.

• Геморрагический синдром чаще проявляется кровоизлияниями в мозг.

• Состояние в межприступном периоде нарушается чаще.

• Чаще развиваются специфические и неспецифические осложнения, а также резидуальные явления.

• Вторичное ИДС развивается раньше и держится дольше, позже появляется серологический ответ.

Особенности коклюша у привитых детей

• Преобладают легкие и среднетяжелые формы.

• Часто встречаются атипичные формы.

• Инкубационный и катаральный периоды удлиняются до 14 дней.

• Период судорожного кашля укорачивается до 2 недель.

• Репризы и рвота после кашля отмечаются реже.

• Геморрагический и отечный синдромы не характерны.

• Состояние в межприступном периоде нарушается реже.

• Специфические осложнения редки и не носят угрожающего жизни характера.

• Резидуальные явления и летальные исходы не регистрируют.

• Гематологические изменения менее выражены.

• При бактериологическом обследовании чаще выделяют *B. pertussis* серотипа 1.0.3.

• Часто выявляют высокий поствакцинальный титр, что требует обследования в динамике; рост титров антител более интенсивный и проявляется в течение 7—10 дней.

Особенности коклюша у подростков и взрослых

• Чаще болеют женщины.

• Преимущественно отмечаются атипичные или легкие формы.

• Специфические осложнения редки, угрожающие жизни осложнения и летальные исходы не встречаются.

5. Лабораторная диагностика

Лабораторные исследования проводят с диагностической целью и по эпидемическим показаниям:

1) *с диагностической целью:*

• детям, кашляющим в течение 7 дней и более, независимо от указаний на контакт с больным коклюшем;

• детям с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания по клиническим данным;

• взрослым с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания, работающим в родильных домах, детских больницах, санаториях, детских образовательных учреждениях и школах, в т. ч. закрытого типа.

2) *по эпидемическим показаниям* (лицам, бывшим в контакте с больным):

• детям, посещающим детские образовательные учреждения, находящимся в детских больницах, санаториях, в которых были выявлены больные коклюшем / паракоклюшем, а также всем детям до 14 лет, общавшимся с больным коклюшем / паракоклюшем в домашних условиях;

• взрослым, работающим в указанных выше детских учреждениях, при выявлении в них больных коклюшем / паракоклюшем, а также при общении с больным коклюшем / паракоклюшем в домашних условиях.

5.1. Критерии лабораторного подтверждения диагноза

Диагноз «*коклюш, вызванный B. pertussis*» ставится при подтверждении клинического диагноза «коклюш» хотя бы одним из указанных методов:

• выделение культуры *B.pertussis*,

• обнаружение специфического фрагмента генома *B. pertussis* методом ПЦР,

• у привитых детей и взрослых: выраженная сероконверсия, т. е. увеличение или уменьшение в 4 и более раз уровня специфических IgG и/или IgA (ИФА), или уровня агглютинирующих антител (РА) при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом не менее 2 недель,

• у взрослых: допустимо однократное обнаружение специфических IgM (ИФА),

• у непривитых детей: однократное обнаружение специфических IgM и/или IgA и/или IgG (ИФА), или антител в титре 1/80 и более (РА).

Диагноз «*коклюш, вызванный B. parapertussis*» ставится в случае:

• выделения культуры *B. parapertussis*,

• или при обнаружении фрагмента генома *B. parapertussis* методом ПЦР,

• или при обнаружении антител к *B. parapertussis* методом РА в титре не менее 1/80.

Диагноз *«бронхисептикоз»* ставится при выделении культуры *B. bronchiseptica* или при обнаружении специфического фрагмента генома *B. bronchiseptica* методом ПЦР.

5.2. Сроки обследования

Бактериологическое обследование следует проводить на ранних сроках заболевания (не позднее третьей недели), до начала терапии антибактериальными препаратами. В более поздние сроки и на фоне антибиотикотерапии высеваемость резко снижается.

Обследование методом ПЦР нередко оказывается эффективнее бактериологического метода в более поздние сроки заболевания и на

фоне лечения антибиотиками, однако максимальная эффективность метода приходится на ранние сроки (1—3 недели от начала заболевания), прием антибиотиков может привести к ложноотрицательному результату анализа.

Серологическое обследование

При первичной инфекции антитела классов IgM и IgA образуются не раньше второй недели от появления клинических симптомов, спустя еще 1 неделю начинают обнаруживаться и антитела класса IgG, достигая своего максимума к 6—8 неделе, после чего их уровень снижается. После вакцинации образуются антитела класса IgG. IgG-антитела могут выявляться до достижения взрослого возраста в низкой концентрации. В связи с этим серологическую диагностику коклюша и паракоклюша целесообразно применять не ранее третьей недели болезни; оптимальные сроки для серологической диагностики – с 3 по 6 неделю заболевания. В течение 1 года после вакцинации против коклюша проводить серологическое исследование в диагностических целях не рекомендуется. Следует учитывать, что у детей в возрасте до 3 месяцев собственные антитела не вырабатываются, но могут присутствовать материнские антитела, которые, как правило, определяются в низких титрах.

Таблица 5

Рекомендуемая схема лабораторной диагностики коклюша/паракоклюша

Методы / Категории обследуемых	1—2 недели от начала заболевания		3—4 недели		более 4 недель
	без лечения АБ	на фоне АБ	без лечения АБ	на фоне АБ	без лечения или с ним
Непривитые дети до 1 года	БМ*, ПЦР	ПЦР	БМ, ПЦР	ПЦР, серология	Серология
Непривитые дети старше 1 года	БМ, ПЦР	ПЦР	ПЦР, серология (БМ**)	Серология (ПЦР)	Серология
Привитые дети, подростки, взрослые	ПЦР, БМ	ПЦР	ПЦР, серология (БМ)	Серология (ПЦР)	Серология

* БМ – бактериологический метод.

** Эффективность метода, указанного в скобках, у данной группы пациентов существенно снижается

5.3. Оформление направления материала на исследование

На доставляемый в лабораторию материал должно быть оформлено направление, где указывается:

а) наименование учреждения, направившего материал на исследование;

б) фамилия, имя, отчество, возраст и домашний адрес обследуемого;

в) причина обследования;

г) вакцинальный статус (количество полученных доз вакцины против коклюша с указанием вакцины);

д) дата заболевания;

е) дата и время взятия материала;

ж) кратность обследования;

з) наименование материала и метод взятия его;

и) метод лабораторной диагностики;

к) подпись лица, взявшего материал.

6. Бактериологическое исследование

Бактериологическое исследование с диагностической целью следует проводить двукратно ежедневно или через день в ранние сроки заболевания (не позднее 3-й недели болезни). В более поздние сроки высеваемость резко снижается. Высеваемость зависит от следующих факторов:

- срока обследования;
- кратности исследования;
- соблюдения правил взятия, транспортирования и посева материала;
- качества используемых материалов и сред.

При посеве материала с диагностической целью рекомендуется использовать 2 чашки со средой КУА, а по эпидемическим показаниям – 1 чашку.

6.1. Взятие материала

Все работы по взятию, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

Исследуемым материалом является слизь из верхних дыхательных путей, осаждающаяся при кашле на задней стенке глотки. Взятие материала может проводиться следующими способами: заднеглоточным тампоном, «кашлевыми пластинками». Заднеглоточным тампоном материал забирают как с диагностической целью, так и по эпидемическим показаниям. Метод «кашлевых пластинок» используют только с диагно-

стической целью при наличии кашля. У детей грудного возраста рекомендуется брать материал заднеглоточным тампоном.

Взятие материала *заднеглоточным тампоном* должно проводиться специально выделенным инструктированным персоналом: медицинскими сестрами детских поликлиник и детских учреждений, помощниками эпидемиологов, лаборантами. Материал берут в детских поликлиниках в специально выделенном помещении, исключающем контакт с другими детьми, а также в детских учреждениях и на дому. При взятии материала должна быть полностью исключена возможность взаимного заражения обследуемых. Материал забирают натощак или через 2—3 ч после еды. Взятие материала у взрослых производят в бактериологических лабораториях и в детских учреждениях при обследовании на коклюш и паракоклюш.

Для взятия материала используют либо тампоны, изготовленные в лаборатории и предварительно (до стерилизации) изогнутые под тупым углом (110—120°), либо стерильные тампоны из хлопка или вискозы на алюминиевой основе в индивидуальной пластиковой пробирке (их можно изогнуть при извлечении из пробирки). Для увеличения числа положительных находок коклюшного и паракоклюшного микробов сбор материала рекомендуется производить двумя тампонами: сухим и смоченным забуференным физиологическим раствором по прописи Е. А. Кузнецова. Взятие материала сухим тампоном стимулирует кашель и повышает возможность выделения возбудителя при взятии материала вторым влажным тампоном. Материал с сухого тампона засевают на чашку Петри с одной из рекомендованных питательных сред обязательно на месте взятия, а с влажного посев можно произвести после доставки тампона в лабораторию, но не позднее чем через 2—4 ч после взятия материала.

Методика взятия материала сухим и увлажненным тампонами одинакова и сводится к следующему. Медицинский работник левой рукой фиксирует с помощью шпателя корень языка, а правой вводит тампон в полость рта, продвигая его за корень языка. Тампон не должен касаться слизистой щек, языка и миндалин. Кончиком тампона и выпуклой его частью касаются задней стенки глотки, проводя по ней справа налево 2—3 раза. Затем так же осторожно над шпателем извлекают тампон из полости рта. В обоих случаях посев желательно производить на 2 чашки Петри. Если ребенок проявляет признаки беспокойства, то стоящий за его спиной помощник сзади фиксирует голову.

Взятие материала «*кашлевыми пластинками*», кроме медицинского персонала, можно поручить родителям, хорошо проинструктировав их. Сбор материала производят на 2 чашки с питательной средой. Во время

приступа кашля левой рукой снимают крышку чашки, а правой подносят ее ко рту на расстоянии 10—12 см так, чтобы капельки слизи из дыхательных путей попали на поверхность среды. Чашку в таком положении держат некоторое время (в течение 6—8 кашлевых толчков). При непродолжительном покашливании можно эту чашку поднести повторно. На питательную среду не должны попадать слюна, рвотные массы, мокрота. Затем чашку с питательной средой закрывают крышкой и доставляют в лабораторию.

В большинстве стран мира материалом для исследования служит слизь из носоглотки, которую отбирают *носоглоточным тампоном* или путем аспирации. Взятие может производиться только специально обученным персоналом. Мазки со слизистой носоглотки берут сухим стерильным назофарингеальным велюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3—4 см для детей и 5—6 см для взрослых).

6.2. Доставка материала

Материал на увлажненных тампонах и посевы материала, сделанные в учреждении, необходимо направлять в лабораторию, сопроводив направлением (см. п. 5.3). При транспортировании следует оберегать материал от прямых солнечных лучей, сохраняя его при температуре 35—37 °С, для чего рекомендуется помещать весь материал в специальные ящики, биксы с защищающей прокладкой (марлевые ватники и др.) и грелкой. Транспортирование материала на влажных тампонах должно занимать не более 2—4 ч.

6.3. Ход исследования

Бактериологический метод исследования предусматривает выделение возбудителя заболевания путем посева на плотные питательные среды, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителей рода бордетелла до вида. Исследование продолжается в течение 5—7 дней.

Первый день исследования

1) Посев материала, взятого тампоном, производят последовательно на 1—2 чашки с питательной средой, предварительно обработанной антибиотиком для подавления сопутствующей микрофлоры (при взятии материала «кашлевыми пластинками» среду антибиотиками не обраба-

тывают). Материал, взятый тампоном, можно посеять следующими способами:

а) посев материала производят путем тщательного втирания его тампоном вначале по периферии среды чашки Петри в виде 4—5 площадок, а затем Z-образным штрихом в центре чашки, затем стерильным шпателем растирают центральные части посева, не касаясь площадок;

б) можно использовать метод секторных посевов (метод Gould): материал втирается тампоном в сектор А, после этого стерильным шпателем или петлей производят 4 штриховых посева из сектора А в сектор I, затем петлю / шпатель прожигают и аналогичным образом производят штриховые посевы из сектора I в сектор II и из II в III.

2) Засеянные чашки (тампоном или «кашлевыми пластинками») помещают в термостат при температуре 35—37 °С (лучше 35 °С) на 3 суток (72 ч). Для увлажнения воздуха в термостат ставят сосуд с водой.

Четвертый день исследования (72 ч)

1) Просматривают посевы на чашках с питательной средой с целью отбора подозрительных колоний микробов рода бордетелла. Просмотр колоний производят при помощи бинокулярного стереоскопического микроскопа или бинокулярной лупы с большим фокусным расстоянием. Колонии микробов рода бордетелла при росте на плотных питательных средах выпуклые, влажные, гладкие, блестящие с ровными краями, серого цвета с голубоватым, жемчужным или металлическим, а иногда желтоватым или беловатым оттенком. Колонии *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* имеют мягкую (маслянистую) консистенцию и легко снимаются. При пересмотре колоний в стереоскопическом микроскопе можно наблюдать узкий луч света («хвостик»), отходящий от ее центра. Колонии *B. bronchiseptica* в субкультуре могут быть двух видов: сходные с коклюшными и более плоские, с приподнятым центром.

Сроки появления колоний различны: колонии *B. bronchiseptica* появляются через 18—24 ч, *B. parapertussis* – через 24—48 ч и *B. pertussis* – через 48—72 ч. Различная скорость роста отражается на величине колоний при просмотре их через 72 ч (см. табл. 1). На средах с кровью вокруг колоний почти всегда образуется зона слабого гемолиза.

Рост коклюшного и бронхисептического микробов на питательной среде не сопровождается изменением ее цвета. Паракоклюшные микробы при обильном росте на среде КУА вызывают диффузное окрашивание среды в буровато-коричневый цвет, что выявляется при просмотре в проходящем свете, а также вызывают потемнение среды с кровью.

2) При наличии на среде выращивания подозрительных колоний производят выделение чистой культуры путем отсева их в чашки Петри

с одной из питательных сред. При этом поверхность среды делят на несколько секторов и отсевают каждую колонию на отдельный сектор, тщательно втирая ее в среду круговыми движениями.

3) При наличии значительного количества однотипных подозрительных колоний, помимо выделения чистой культуры, из оставшихся колоний делают мазки в физиологическом растворе, определяя морфологию культуры при окраске по Граму. Одновременно определяют также отсутствие спонтанной агглютинации. Микробы рода бордетелла имеют вид мономорфных мелких овоидных палочек (коккобактерий), равномерно располагаются в мазке, грамотрицательны. Иногда паракоклюшные микробы, особенно со среды Борде-Жангу, могут иметь вид удлиненных полиморфных палочек.

Культуру из оставшихся колоний проверяют в реакции агглютинации на стекле со специфическими видовыми неадсорбированными сыворотками, разведенными 1 : 10, и по возможности с адсорбированными монорецепторными сыворотками к агглютиногенам (факторам) 1 и 14.

Если число подозрительных колоний значительно, то возможна постановка пробы Закса для определения наличия фермента уреазы.

4) На основании изучения характера колоний и морфологии клеток в мазках, окрашенных по Граму, положительной реакции агглютинации с видовыми неадсорбированными и адсорбированными сыворотками к факторам 1 и 14 на третьи сутки можно выдать предварительный ответ.

5) При отсутствии роста подозрительных колоний на среде выращивания чашки Петри вновь помещают в термостат на 24—48 ч и просматривают повторно в соответствующие сроки.

Пятый-шестой день исследования (96—120 ч)

1) Просматривают посевы, произведенные для выделения чистой культуры, и отмечают изменение цвета среды: паракоклюшные микробы диффузно окрашивают среду выращивания (КУА) в буровато-коричневый цвет.

2) На предметном стекле в капле физиологического раствора готовят мазки и окрашивают их по Граму, определяют морфологию выделенной культуры, ее чистоту, а также отсутствие спонтанной агглютинации.

3) Серологические свойства проверяют в реакции агглютинации на стекле со специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками, разведенными 1 : 10, а также с адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам 1 и 14. Сероварианта коклюшного микроба определяют агглютинацией с монорецепторными сыворотками к факторам 1, 2, 3.

4) Для проверки биохимических свойств производят посевы чистой культуры на агаровую среду с тирозином (определение наличия тирозиназы), определяют наличие уреазы пробой Заксе или посевом на бульон Хоттингера с мочевиной. При подозрении на выделение чистой культуры *B. bronchiseptica* определяют утилизацию цитрата на среде Симмонса и подвижность путем посева на среду полужидкий агар (0,5 % агар-агара).

B. pertussis биохимически инертна: не растет на мясопептонном агаре, не изменяет цвета агаровой среды с тирозином, не имеет фермента уреазы (проба Заксе отрицательная), не утилизирует цитраты.

B. parapertussis дает рост на простых питательных средах, изменяет среды с тирозином в коричневый цвет, обладает ферментом уреазой (проба Заксе положительная).

B. bronchiseptica отличается быстрым ростом на простых питательных средах, подвижностью, не изменяет цвета среды с тирозином, обладает ферментом уреазой (проба Заксе положительная через 4 ч), способна утилизировать цитраты на среде Симмонса.

5) На основании изучения чистой культуры: морфологии колоний и клеток, реакции агглютинации с видовыми неадсорбированными сыворотками и адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам 1 и 14, результатов пробы на уреазу, изменения цвета среды с тирозином, утилизации цитратов может быть выдан окончательный положительный ответ.

6) Если в течение пяти суток (на 6 день исследования) на среде выращивания не обнаружены колонии, подозрительные для бактерий рода бордетелла, наблюдение прекращают и выдают окончательный отрицательный ответ.

Методика изучения ферментативной активности и ее учет

1) Для определения *уреазной активности* микробов смесь реактивов А (1 часть) и Б (19 частей) разливают по 0,1—0,2 мл в стерильные агглютинационные пробирки (с пробками) и вносят 1—2 петли испытуемой культуры. Пробирки помещают в термостат при 35—37 °С на 30 мин. Учет результатов производят после инкубирования, а при отсутствии изменения цвета смеси пробирки оставляют при комнатной температуре и результат учитывают на следующий день. Одновременно ставят контроль реактива без внесения культуры. При наличии у микробов фермента уреазы происходит расщепление мочевины до аммиака, что приводит к защелачиванию среды, изменяя ее цвет из желтого в малиновый.

2) Для определения *потребности в цитратах* делают посев испытуемой культуры на скошенный агар среды Симмонса. Пробирки инкубируют при 37 °С одни сутки. Цитратассимилирующие бактерии хорошо растут, подщелачивают среду и вызывают окрашивание ее в синий цвет. Микробы, не ассимилирующие цитраты на этой среде, не растут и не меняют ее цвета.

3) Для определения *пигментообразования* производят посев выделенной культуры на простой питательный агар с 0,1 % тирозина с инкубацией в течение суток при 37 °С. При расщеплении тирозина среда окрашивается в желто-коричневый цвет.

Схема бактериологического исследования

1-й день

Посев исследуемого материала на среды выращивания и инкубирование в термостате при 35—37 °С.

4-й день (через 72 ч)

1) Изучение характера колоний на средах выращивания с использованием стереоскопического микроскопа.

2) Отсев колоний для получения чистой культуры микроба.

3) При наличии большого числа колоний на среде выращивания:

а) приготовление мазков, окраска их по Граму, микроскопия;

б) постановка реакции агглютинации на стекле со специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками в разведении 1 : 10 и специфическими монорецепторными сыворотками к агглютиногенам (факторам) 1 и 14;

в) постановка пробы на уреазу.

4) Выдача предварительного положительного результата проведенного исследования.

5-й день (через 96 ч)

Изучение выделенной чистой культуры в случае наличия в исследуемом материале паракоклюшного или бронхисептического микробов:

а) изучение характера роста чистой культуры и изменения цвета питательной среды;

б) приготовление мазков и окраска их по Граму, микроскопия;

в) постановка реакции агглютинации на стекле с видовыми неадсорбированными и монорецепторными сыворотками к агглютиногенам (факторам) 1, 14 и 12;

г) постановка пробы на уреазу и учет результатов;

д) посев на среду с МПА с тирозином;

ж) при необходимости определение подвижности путем посева в столбик полужидкого агара;

е) посев на среду Симмонса.

6-й день (через 120 ч)

1) Изучение выделенной культуры коклюшного микроба или в случае позднего роста паракоклюшного по схеме пятого дня исследования.

2) Учет результатов пятого дня исследования.

3) Определение сероварианта коклюшного микроба.

4) Выдача окончательного ответа: положительного или отрицательного.

Примечание: При отсутствии роста подозрительных колоний на четвертый день исследования чашки со средой выращивания просматривают на пятый и шестой дни. Дальнейший ход исследования продолжается по схеме.

Атипичные штаммы B. pertussis

В очагах коклюшной инфекции могут быть обнаружены атипичные штаммы коклюшного микроба. Они отличаются от типичных культур морфологическими свойствами и характером колоний. В среде выращивания (КУА) такие штаммы образуют через 72 ч роста иногда более крупные колонии, с плоской поверхностью, западающим центром, имеют беловатый, бурый, желтоватый или слегка розоватый и зеленоватый цвет, маслянистую консистенцию. Морфология клеток в мазках из колоний может отличаться от типичной: встречаются более длинные палочки, раздутые овоидные палочки с ослизненным концом, формы в виде стрептобацилл. Чистая культура, выделенная из таких колоний, обладает типичными для коклюшного микроба свойствами. Биохимические и серологические свойства атипичных штаммов характерны для коклюшного микроба: они не разлагают мочевину и тирозин, агглютинируются на стекле специфическими видовыми неадсорбированными сыворотками, типируются моноспецифическими рецепторными сыворотками к факторам 1, 2, 3.

Примечание: В ряде случаев из зева детей и взрослых могут быть выделены грамотрицательные бактерии, сходные с коклюшным микробом по морфологии, виду колоний и серологическим свойствам. В чистой культуре они представляют собой грамотрицательные овоидные палочки, образуют сходные с типичными коклюшными микробами колонии, агглютинируются на стекле видовыми неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками, дают положительную реакцию агглютинации в пробирках в разведениях до 1 : 320 и не агглютинируются монорецепторными сыворотками. Специальные исследования в реакции иммуноэлектрофореза показали, что они не имеют антигенов, характерных для коклюшного и паракоклюшного микробов, и хорошо растут на простых питательных средах.

В случае обнаружения грамотрицательных бактерий, которые не могут быть идентифицированы как возбудители коклюша и паракоклю-

ша, культуру можно пересылать в Референс-центр по мониторингу за коклюшем и дифтерией МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского.

Учитывая наличие атипичных штаммов коклюшного микроба, рекомендуется при выделении чистой культуры производить отсев с питательной среды максимального числа колоний всех видов, в среднем не менее пяти.

Сроки выдачи и формулировка ответов

Ответ при исследовании на коклюш и паракоклюш выдается, как правило, на 4—6 дни. Предварительный положительный ответ может быть выдан на 4 день с формулировкой: «Обнаружены микробы, подозрительные на бактерии рода бордетелла, исследование продолжается». Окончательный положительный ответ может быть выдан на 5—6 дни и формулируется: «Обнаружены *B. pertussis* (*B. parapertussis, B. bronchiseptica*)». Отрицательный ответ выдается на 6 день при отсутствии подозрительных колоний для бактерий рода бордетелла и формулируется: «Коклюшные (паракоклюшные, бронхисептические) микробы не обнаружены». В случае замедленного роста микробов или выделения нетипичной культуры предварительный и окончательный ответы могут быть выданы позже (7—8 дни).

6.4. Материалы и оборудование

Сваб-система (стерильный зонд-тампон алюминий / вискоза в пробирке) без наполнителя или тампоны, приготовленные в лаборатории	
Бинокулярный стереоскопический микроскоп или бинокулярная лупа с большим фокусным расстоянием	
Термостат, поддерживающий температуру (36 ± 1) °С	
Чашки Петри стеклянные или пластиковые	ГОСТ 23932—90
Петли микробиологические	
Пипетки	ГОСТ 29227—91
Пробирки бактериологические	ГОСТ 25336—82
Кровь баранья дефибринированная для питательных сред	
Казеиново-угольный агар (КУА)	ФС 42-3671—98
Пенициллин или цефалексин (*Bordetella selective supplement*)	
Сыворотка крови крупного рогатого скота жидкая	
Питательная среда 199 стерильная жидкая	
Набор для окраски мазков по Граму	

Набор для микроскопии:	
стекла покровные для микропрепаратов	ГОСТ 6672
стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 9284
иммерсионное масло	ГОСТ 13739—78
Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Среда Симмонса	
Бульон мясопептонный (бульон Хоттингера)	ТУ 10-02-789-176—94
Мочевина	ГОСТ 6691—76
Крезоловый красный	ТУ 6-09-5207—85
Сыворотка диагностическая коклюшная агглютинирующая сухая	ФС 42-3876—99
Сыворотка диагностическая паракоклюшная агглютинирующая сухая	ФС 42-3875—99
Сыворотки к агглютиногенам (факторам) 1, 2, 3 коклюшного микроба и 14 – паракоклюшного микроба	ФС 42-3584—98

7. Полимеразная цепная реакция

Обнаружение ДНК *Bordetella pertussis,* ДНК *Bordetella parapertussis,* ДНК *Bordetella bronchiseptica* проводят методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Суть метода состоит в многократном копировании (амплификации) специфических участков ДНК искомых бактерий, в процессе повторения от 35 до 45 раз запрограммированных циклов, состоящих из трех (как правило) режимов температуры, удерживаемой определенное время. Амплификация участков ДНК происходит на специальном оборудовании (амплификаторах) с помощью термостабильного фермента Taq-полимеразы, который достраивает нуклеотидную последовательность после коротких олигонуклеотидов (праймеров), комплементарно связывающихся с искомым участком ДНК.

На первом этапе анализа проводится обработка исследуемого биологического материала с целью экстракции (выделения) ДНК возбудителя и удаления или нейтрализации ингибиторов реакции амплификации. С целью обеспечения качества выполнения процедуры исследования, для каждого образца целесообразно использовать внутренний контрольный образец, который добавляется в биологический образец на этапе экстракции ДНК. На втором этапе проводится собственно амплификация фрагмента ДНК искомого микроорганизма и далее визуализация (детекция) результата. Последний этап – детекция фрагментов амплификации может проводиться различными методами. Более дешевым методом является метод электрофореза в агарозном геле, однако этот способ сопряжен с повышенным риском контаминации лаборатории

фрагментами ПЦР, что может привести к ложно-положительным результатам исследования, особенно при несоблюдении жестких правил организации лаборатории и порядка выполнения процедур.

Использование в ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции в процессе реакции, позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала как во время амплификации (в режиме реального времени), так и по ее окончании. Этот способ значительно снижает риск загрязнения лаборатории продуктами ПЦР и сокращает продолжительность анализа.

В условиях высокого охвата детей прививками против коклюша снижается эффективность бактериологического исследования и возрастает роль ПЦР как быстрого (в течение 4—6 ч) метода, позволяющего обнаружить ДНК возбудителя на более поздних сроках заболевания, чем бактериологический метод, и на фоне проведения антибиотикотерапии. При этом наличие в анамнезе вакцинации против коклюша не влияет на результаты ПЦР.

Необходимо учитывать, что в ПЦР обнаруживается также ДНК погибших микробов, которая сохраняется в биологическом материале дольше, чем жизнеспособные микроорганизмы (от 1 недели до 1 месяца). В связи с этим ДНК может быть обнаружена на фоне клинического выздоровления и после успешного лечения антибиотиками, поэтому ПЦР не рекомендуется использовать для подтверждения эффективности лечения, как это принято при бактериологическом исследовании или при использовании метода NASBA, в котором обнаруживается РНК бактерий (менее стабильного компонента генома, чем ДНК).

Максимальный уровень специфичности и чувствительности исследования обеспечивают тесты на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Оптимальные сроки применения ПЦР в диагностических целях – с первых дней катарального периода заболевания и до трех недель болезни на момент обследования.

7.1. Взятие материала

Крайне важно проводить сбор материала для ПЦР до назначения специфической противомикробной терапии. Несоблюдение данного условия может привести к ложноотрицательному результату анализа.

Все работы по взятию, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

Материалом для исследования методом ПЦР служат мазки со слизистой носоглотки и задней стенки ротоглотки. Рекомендуется исследовать оба типа мазков от каждого пациента. С этой целью целесообразно объединять и исследовать как одну пробу оба мазка, собранных последовательно разными зондами в одну пробирку. При этом сначала берут мазок со слизистой носоглотки, затем мазки с задней стенки ротоглотки, помещая рабочую часть зонда с тампоном в ту же пробирку, в которую был ранее помещен конец зонда с тампоном, содержащим собранный материал со слизистой носоглотки. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. За 2 ч до взятия мазков из ротоглотки нельзя пить и принимать пищу. В течение 6 ч перед процедурой нельзя использовать медикаменты, орошающие носоглотку или ротоглотку и препараты для рассасывания во рту.

Мазки со слизистой носоглотки берут сухим стерильным назофарингеальным велюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3—4 см для детей и 5—6 см для взрослых). После взятия материала конец зонда с тампоном опускают в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды до места слома, при этом гибкая часть зонда сворачивается спиралью, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда. Пробирку герметично закрывают.

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами из полистирола с вискозными тампонами вращательными движениями с задней стенки ротоглотки, аккуратно прижимая язык пациента шпателем, не касаясь щек, миндалин и языка. После взятия материала рабочую часть зонда с тампоном помещают на глубину 1,5 см в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды. Рукоятку зонда с тампоном опускают вниз и отламывают, придерживая крышкой пробирки с расче-

том, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку герметично закрывают и маркируют.

7.2. Доставка и хранение материала

Допускается хранение материала в течение трех суток при температуре 2—8 °С, более длительно – при температуре не выше минус 16 °С.

Каждая пробирка с биологическим материалом должна быть проверена на герметичность и промаркирована в соответствии с прилагаемым списком. Направление оформляется согласно п. 5.3. Пробирку с биологическим материалом от каждого пациента помещают в индивидуальный полиэтиленовый пакет подходящего размера с ватой (или другим гигроскопичным материалом) в количестве, достаточном для адсорбции всего образца в случае его утечки, пакет герметично закрывают. При необходимости транспортирования материала от нескольких пациентов индивидуальные пакеты помещают в пакет большего объема. Полиэтиленовые пакеты помещают в термоизолирующий контейнер (термос, сумка-холодильник), приспособленный для транспортирования биологических материалов, и транспортируют при температуре 4—8 °С.

7.3. Проведение исследования

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

Подготовка биологического материала к ПЦР-исследованию

Непосредственно перед исследованием содержимое закрытой пробирки с мазками из носоглотки / ротоглотки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс. g на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Открыть пробирку и, не извлекая зондов, отобрать необходимое количество образца для исследования.

Порядок проведения ПЦР-исследования

Исследование проводится с использованием наборов реагентов, разрешенных для применения в установленном порядке. Оборудование и материалы, необходимые для проведения ПЦР-исследования, указаны в МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности» и в инструкциях к используемым наборам реагентов для обнаружения ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза методом ПЦР.

Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в двух отдельных помещениях (зонах: зона экстракции нуклеиновых кислот и зона амплификации нуклеиновых кислот) при проведении ПЦР с детекцией в режиме реального времени и в трех отдельных помещениях (зонах: зона экстракции нуклеиновых кислот, зона амплификации нуклеиновых кислот и зона детекции нуклеиновых кислот) при проведении ПЦР с детекцией методом электрофореза. Работу следует начинать в зоне экстракции нуклеиновых кислот, продолжать в зонах амплификации и детекции. Нельзя возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое. Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы (включая буфер и гели) следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». При работе методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов. Жесткие требования должны быть предъявлены к организации работы в зоне электрофореза: запрещается перемещение персонала из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза.

Порядок проведения ПЦР-исследования и интерпретация результатов анализа должны выполняться строго согласно инструкции изготовителя набора реагентов. С целью обеспечения качества процедуры исследования каждого образца целесообразно использовать внутренний контрольный образец, который добавляется в биологический образец на этапе экстракции ДНК. Обязательно использование отрицательных кон-

трольных образцов этапов экстракции ДНК и постановки ПЦР, а также положительного контрольного образца этапа ПЦР.

С целью обеспечения контроля качества ПЦР-анализа периодически рекомендуется проводить контроль контаминации лаборатории фрагментами амплификации ДНК согласно методике, представленной в прилож. 9.

7.4. Материалы и оборудование

Материалы, необходимые для взятия образцов для исследования методом ПЦР

1) Транспортная среда для хранения и транспортирования респираторных мазков или: стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида (ГОСТ 4233) в 0,01 М калий-фосфатном буфере, pH 7,0 (смесь KH_2PO_4 (ГОСТ 2493) и K_2HPO_4 (ГОСТ 4198)), в аликвотах по 0,5 мл в стерильных пробирках объемом 1,5 мл, раскапанный в стерильных условиях.

2) Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе – зонд для взятия мазков со слизистой носоглотки у детей.

3) Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе – зонд для взятия мазков со слизистой носоглотки у взрослых.

4) Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых, допустимо его использование для взятия мазков со слизистой носоглотки у взрослых.

Материалы, необходимые для проведения исследования методом ПЦР

Материалы и оборудование для этапа экстракции ДНК

1) Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК, разрешенные для применения в установленном порядке и рекомендованные в инструкциях наборов реагентов для ПЦР-диагностики коклюша и паракоклюша.

2) Ламинарный бокс, класс биологической безопасности II тип А.

3) Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.

4) Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс. об./мин.

5) Вортекс.

6) Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

7) Набор электронных или механических дозаторов переменного объема от 10 до 200 мкл и от 100 до 1 000 мкл.

8) Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл.

9) Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1 000 мкл.

10) Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл.

11) Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл и наконечников.

12) Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

13) Отдельный халат и одноразовые перчатки.

14) Емкость с дезинфицирующим раствором.

Материалы и оборудование для этапа постановки ПЦР с детекцией в режиме реального времени

1) Наборы реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, разрешенные к применению в установленном порядке.

2) Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

3) Центрифуга/вортекс.

4) Автоматические и электронные дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).

5) Одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200 мкл.

6) Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.

7) Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.

8) Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569—09.

9) Емкость для сброса наконечников.

10) Программируемый амплификатор роторного типа или амплификатор планшетного типа, рекомендованные в инструкциях и методических рекомендациях по применению используемого набора реагентов для ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

11) Одноразовые полипропиленовые тонкостенные пробирки для ПЦР в соответствии с инструкцией по применению используемого набора реагентов объемом:

а) 0,2 мл или 0,1 мл с плоской крышкой – при использовании прибора роторного типа для ПЦР с детекцией в режиме реального времени;

б) 0,2 мл с выпуклой крышкой – при использовании прибора планшетного типа для ПЦР с детекцией в режиме реального времени;

в) 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа для ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Материалы и оборудование для этапа постановки ПЦР с детекцией методом электрофореза

Для проведения амплификации

1) Амплификатор для пробирок 0,5 мл или 0,2 мл.

2) ПЦР-бокс.

3) Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.

4) Вортекс.

5) Набор электронных или механических дозаторов переменного объема.

6) Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР на 0,5 (0,2) мл.

7) Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл.

8) Штативы для наконечников и пробирок на 0,5 (0,2) мл.

9) Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

10) Отдельный халат и одноразовые перчатки.

11) Емкость для сброса наконечников.

Для детекции продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле

1) Камера для горизонтального электрофореза объёмом не более 400 мл.

2) Источник постоянного тока с напряжением 150—460 В.

3) Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.

4) Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов и передачи изображения.

5) Аквадистиллятор.

6) Холодильник от 2 до 8 °С.

7) Микроволновая печь для плавления агарозы.

8) Колба коническая из термостойкого стекла на 250 мл (ГОСТ 21400—75) для плавления агарозы .

9) Мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770—74).

10) Штатив для пробирок на 0,5 (0,2) мл.

11) Отдельный механический или электронный дозатор объемом 10—40 мкл.

12) Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе.

13) Пластиковая ёмкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

14) Отдельный халат и одноразовые перчатки.

8. Серологические методы исследования

В условиях массовой вакцинопрофилактики существенно снизилось число тяжелых форм заболевания, участились случаи позднего обращения за медицинской помощью, нередко уже на фоне проводимой антибактериальной терапии. При этом возросло значение серологических методов как средств поздней (ретроспективной) диагностики.

Обнаружение специфических антител к возбудителям коклюша проводится с использованием реакции агглютинации (РА) и иммуноферментного анализа (ИФА). В РА обнаруживаются представленные в крови агглютинирующие антитела к *B. pertussis* и *B. parapertussis*. ИФА позволяет обнаруживать антитела классов IgM, IgA и IgG к различным антигенам *B. pertussis* (чаще к коклюшному токсину (PT) и филаментозному гемагглютинину (FHA), наибольшей специфичностью обладают антитела к PT).

При первичной инфекции антитела классов IgM и IgA образуются не раньше второй недели от появления клинических симптомов, спустя еще 1 неделю начинают обнаруживаться и антитела класса IgG, достигая своего максимума к 6—8 неделе, после чего их уровень снижается. IgG-антитела могут выявляться до достижения взрослого возраста в низкой концентрации. В связи с этим серологическую диагностику коклюша и паракоклюша целесообразно применять не ранее второй недели болезни; оптимальные сроки для серологической диагностики – с 3 по 6 неделю заболевания. После вакцинации образуются антитела класса IgG. Поэтому в течение 1 года после вакцинации серологическое исследование в диагностических целях проводить не рекомендуется, а у детей, вакцинированных против коклюша, и у взрослых для серологической диагностики необходимо использовать только парные сыворотки крови, полученные с интервалом минимум 2 недели. При исследовании однократно взятой сыворотки результат по обнаружению антител класса IgG может быть расценен как положительный только в случае высокого титра, при этом значения, которые считаются высоким титром, могут варьировать в наборах реагентов разных производителей, и их следует уточнить в инструкции по применению используемого диагностического набора.

Обнаружение значимого уровня IgM (с различными комбинациями IgG или IgA) у непривитых детей и взрослых следует расценивать как острую инфекцию. Однако у некоторых пациентов при острой инфекции антитела класса IgM определяются на низком уровне. Дети младше 6 месяцев могут не отвечать на инфекцию выработкой антител класса IgA,

поэтому отрицательный результат IgA у детей данного возраста не означает отсутствие заболевания.

В качестве подтверждающего теста для образцов с пограничными или положительными результатами, полученными в ИФА, может быть использован метод иммуноблота, в котором определяются антитела класса IgG и IgA с использованием антигенов *Bordetella pertussis* (PT в двух концентрациях и FHA).

Диагностическим титром в РА у не привитых и не болевших ранее коклюшем детей считают разведение 1 : 80. У иммунизированных детей и взрослых положительные результаты РА учитывают только при исследовании парных сывороток при нарастании титра не менее чем в 4 раза. Следует учитывать, что у детей в возрасте до 3 месяцев собственные антитела не вырабатываются, но могут присутствовать материнские антитела, которые, как правило, определяются в низких титрах.

С целью определения защитного титра антител серологическое исследование проводят через 1,5 месяца после третьей вакцинации или ревакцинации с использованием РА при иммунизации вакциной с цельноклеточным коклюшным компонентом (н.-р., АКДС), ИФА с определением антител класса G к PT (или PT и FHA) – при иммунизации бесклеточной вакциной (н.-р., Инфанрикс, Пентаксим).

8.1. Взятие материала

Взятие крови (для ИФА обязательно натощак) проводят из вены в объеме 3—4 мл или из подушечки третьей фаланги среднего пальца в объеме 0,5—1,0 мл (у детей младшего возраста) в одноразовую пластиковую пробирку без антикоагулянта.

Взятие крови из локтевой вены для получения сыворотки производят одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в пробирку типа Vacuette® без антикоагулянта или одноразовый шприц объемом 5 мл. При заборе в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую стеклянную пробирку. Капиллярную кровь берут из пальца в асептических условиях в пробирки без антикоагулянта. Перед взятием крови кисть руки пациента согревают горячей водой, затем насухо вытирают. Подушечку пальца протирают 70°-м спиртом и прокалывают стерильным скарификатором одноразового использования. Кровь собирают непосредственно через край стерильной одноразовой центрифужной пробирки. После взятия крови место укола смазывают 5 %-м раствором йода. Пробы крови, взятые без антикоагулянта, отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. Затем проводится центрифугирование в течение

10 мин при 3 000 об./мин. По окончании центрифугирования сыворотка переносится в стерильные пробирки с использованием для каждого образца отдельного наконечника с аэрозольным барьером.

8.2. Доставка и хранение материала

Срок хранения крови – не более 6 ч. Сыворотка крови хранится при комнатной температуре в течение 6 ч, при температуре 4—8 °С – в течение 5 сут., более длительно – при температуре не выше минус 16 °С. Многократное замораживание / размораживание сыворотки крови недопустимо.

Каждую пробирку маркируют в соответствии с прилагаемым в сопроводительном документе списком и помещают в полиэтиленовый пакет подходящего размера с ватой (или другим гигроскопичным материалом) в количестве, достаточном для адсорбции всего образца в случае его утечки, и герметично закрывают. Допустимо транспортировать образцы от разных пациентов в одном пакете. Направление материала на исследование оформляется согласно п. 5.3.

Полиэтиленовые пакеты помещают в термоизолирующий контейнер (сумка-холодильник), приспособленный для транспортирования биологических материалов и транспортируют при температуре от 4 до 8 °С. При транспортировании и хранении крови в зимнее время года необходимо создать условия, при которых не происходит ее замораживание.

Пакеты с материалом для ПЦР и серологического исследования могут транспортироваться в одном термоизолирующем контейнере.

8.3. Реакция агглютинации

При использовании РА серологическое исследование сыворотки крови следует проводить одновременно на коклюш и паракоклюш с использованием диагностических наборов, разрешенных в установленном порядке, согласно инструкции производителя.

Из исследуемой сыворотки готовят 9—10 последующих разведений: 1 : 5, 1 : 10 и так далее до 1 : 1 280 или 1 : 2 560. В 10-ю (или 11-ю) пробирку наливают вместо сыворотки 0,25 мл физиологического раствора (контроль). Реакцию агглютинации ставят в объеме 0,5 мл: к 0,25 мл соответствующего разведения сыворотки добавляют 0,5 мл диагностикума. Пробирки помещают в термостат при 37 °С на 2 ч и затем оставляют при комнатной температуре. Результаты учитывают на следующий день с помощью агглютиноскопа. Реакция учитывается как по-

ложительная при наличии в пробирке четкой агглютинации на четыре или три креста (4+ или 3+).

Диагностическим титром реакции агглютинации у непривитых и неболевших детей считают разведение 1 : 80. У иммунизированных детей и взрослых положительные результаты реакции учитывают только при исследовании парных сывороток крови, взятых с интервалом не менее чем 2 недели при нарастании титра не менее чем в 4 раза.

Материалы и оборудование для серологического исследования методом РА

1) 0,9 %-й раствор натрия хлорида pH (7,0 ± 0,2) (ГОСТ 4233).

2) Пробирки для агглютинации, ГОСТ 25336—82.

3) Термостат, обеспечивающий температуру (36 ± 1) °С.

4) Пипетки, ГОСТ 29227—91.

5) Агглютиноскоп.

6) Диагностикум коклюшный жидкий для реакции агглютинации.

7) Диагностикум паракоклюшный жидкий для реакции агглютинации.

8) Одноразовые перчатки.

8.4. Иммуноферментный анализ

Серологическую диагностику методом ИФА проводят с использованием наборов реагентов, разрешенных для применения в установленном порядке, в качественном, полуколичественном и количественном форматах. Для исследования используется сыворотка крови, все манипуляции и интерпретация результатов проводятся по инструкции изготовителя диагностического набора. Результаты учитываются на спектрофотометре при длине волны $^{450}/_{620}$ нм. Расчеты проводятся графоаналитическим методом. Не рекомендуется использование мутных вследствие липемии или загрязненных образцов. Присутствие взвеси или преципитата в сыворотке может быть причиной получения неправильных результатов. Такие образцы перед исследованием должны быть центрифугированы или профильтрованы.

Материалы и оборудование для серологического исследования методом ИФА

1) Наборы реагентов для определения антител (IgG, IgA, IgM) к *Bordetella pertussis* или отдельным антигенам методом ИФА (Anti-Bordetella pertussis toxin ELISA, Bordetella pertussis/toxin ELISA и др.), разрешенные для применения в установленном порядке.

2) Чистые пробирки для разведения образцов сыворотки.

3) Одноразовая пластиковая посуда для разведения концентрата конъюгата.

4) Калиброванные дозаторы и многоканальные дозаторы (диапазоны объемов 5-50, 50-200 и 200-1 000 мкл) и одноразовые сменные наконечники.

5) Мерные цилиндры объемом 50 мл и 1 л, ГОСТ 1770—74.

6) Бутыль для промывочного буфера.

7) Фильтровальная бумага.

8) Вортекс.

9) Водяная баня 37 °С с крышкой или влажная камера, помещенная в инкубатор при 37 °С.

10) ИФА-анализатор с возможностью измерений при 450 и 620 нм.

11) Дистиллированная или дважды деионизированная вода, ГОСТ 6709—72.

12) Одноразовые перчатки.

8.5. Иммуноблот

В качестве подтверждающего теста для образцов с пограничными или положительными результатами, полученными в ИФА, или для самостоятельной диагностики может быть использован метод иммуноблота, в котором определяются антитела класса IgG и IgA в сыворотке крови с использованием антигенов Bordetella pertussis (PT в двух концентрациях и FHA).

Принцип исследования заключается в проведении реакции связывания специфических антител с высоко очищенными рекомбинантными антигенами, нанесенными в виде полос на стрипы из нитроцеллюлозной мембраны, предварительно обработанной раствором белка, с целью блокировки свободных сайтов неспецифического связывания иммуноглобулинов. В ходе анализа стрипы инкубируют с разведенными образцами сыворотки крови человека. Если в образце присутствуют специфические антитела, то во время инкубации они связываются с антигенами, фиксированными на стрипе. После промывки стрипы инкубируют с антителами к IgG или IgA человека, конъюгированными с пероксидазой хрена, и повторяют промывку. Специфически связанные антитела выявляют с помощью цветной реакции, добавляя субстрат, взаимодействующий с пероксидазой хрена. Проявляющиеся темные полосы в соответствующем месте стрипа указывают на присутствие комплекса антиген-антитело. Коклюшный токсин нанесен на стрип в двух концентрациях – PT и PT-100. Концентрация PT стандартизована: положительная реакция на IgG (появление полосы) при взаимодействии исследуемой сыворотки с PT-100 означает, что уровень IgG в сыворотке превышает 100 МЕ/мл по стандарту ВОЗ.

Контроль реакции проводится с использованием четырех полос (бенда), расположенных параллельно одна за другой на верхнем краю стрипа:

1) полоса положительного контроля реакции, которая должна присутствовать при анализе каждой сыворотки;

2) две полосы положительного контроля конъюгата (IgG/IgA), которые служат контролями выявления каждого класса антител;

3) «контроль Cut-off» (для контроля реакции окрашивания): интенсивность этой полосы является основной для оценки реактивности антител и интерпретации результата анализа конкретного стрипа.

Результаты анализа учитываются только в случае получения адекватных результатов контролей. Интенсивность полос зависит от концентрации антител, специфичных к *Bordetella pertussis*, присутствующих в исследуемой сыворотке, оценка результата проводится по отношению к интенсивности полосы Cut-off.

Положительная реакция по обнаружению IgG к PT в титре более 100 МЕ/мл стандарта ВОЗ может расцениваться как признак острой инфекции у не вакцинированных детей или вакцинированных более трех лет назад. В остальных случаях рекомендуется повторное исследование сыворотки или плазмы крови, взятой через 2 недели после первой.

Материалы и оборудование для серологического исследования методом иммуноблота

1) Наборы реагентов для определения антител (IgG, IgA) к антигенам *Bordetella pertussis* методом иммуноблота, разрешенные для применения в установленном порядке.

2) Деионизированная вода.

3) Вакуумный насос.

4) Микродозаторы на 20 и 1 000 мкл с одноразовыми наконечниками.

5) Пластиковые пинцеты.

6) Горизонтальный шейкер.

7) Вортекс.

8) Фильтровальная бумага, ГОСТ 12026.

9) Одноразовые перчатки.

10) Мерный градуированный цилиндр на 50 и 1 000 мл, ГОСТ 1770—74.

11) Одноразовые лотки для инкубации.

9. Нормативно-методические ссылки

1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

3. СанПиН 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4. МУК 4.2.2316—08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

5. СП 3.1.2.1320—03 «Профилактика коклюшной инфекции».

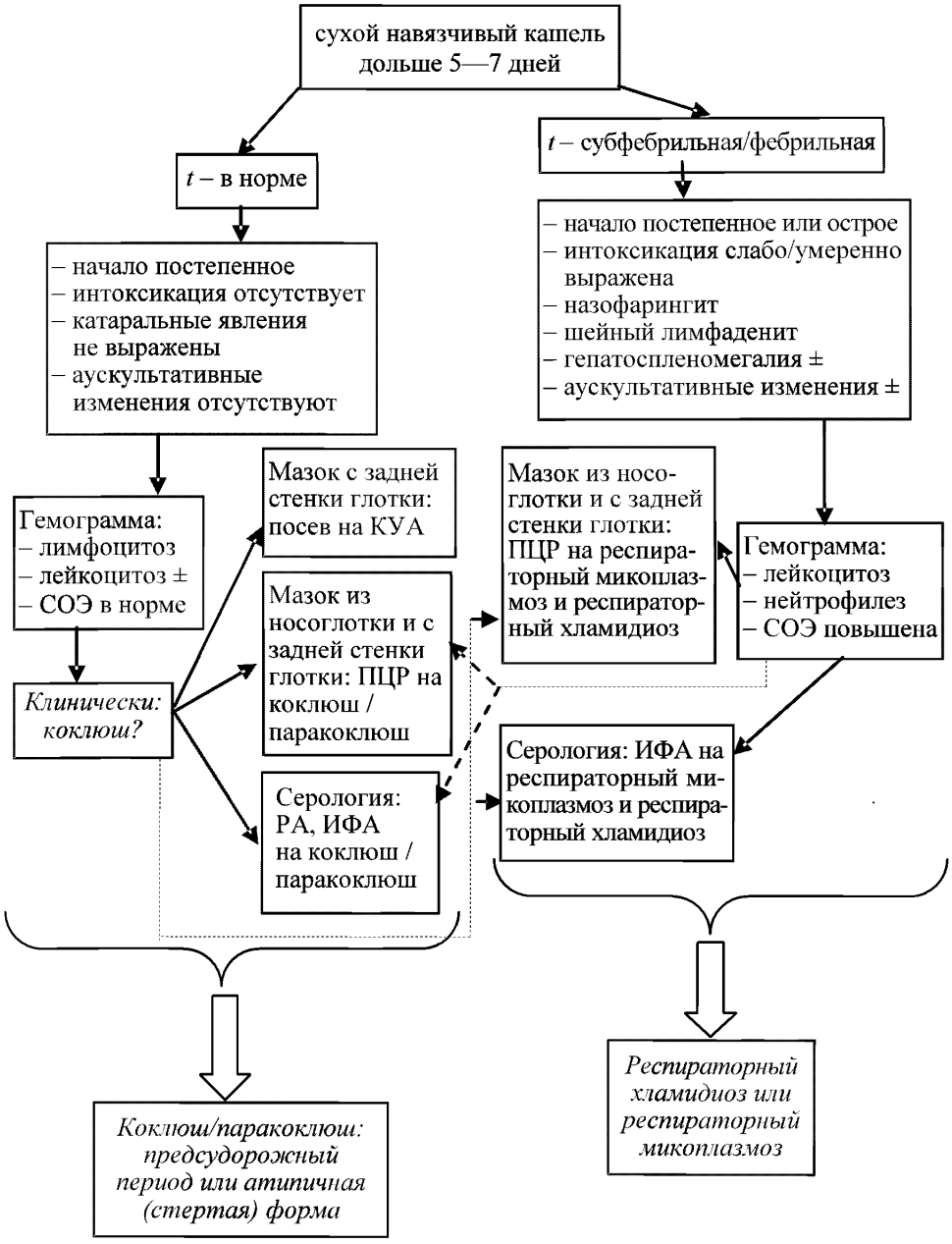
6. МУ 3.1.2.2160—07 «Эпидемиологический надзор за коклюшной инфекцией».

7. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

8. МУ 3.1.2943—11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)».

Приложение 1

Алгоритм выбора метода лабораторной диагностики



Приложение 2

Приготовление и стерилизация тампонов

А. Сухие ватные тампоны: на один конец металлической легко сгибающейся проволоки плотно наматывают слой гигроскопической ваты. Длина намотки должна быть равной 4—5 см (во избежание аспирации ваты). Затем конец проволоки с намоткой ваты (1—2 см) изгибают под тупым углом 110—120°. Другой конец проволоки монтируют в корковую или ватную пробку. Изготовленный тампон помещают в пробирку и стерилизуют в автоклаве при 112 °С в течение 30 мин или в сушильном шкафу при температуре 140—150 °С в течение часа.

Б. Увлажненные тампоны: готовят из легкосгибающейся нержавеющей проволоки (лучше алюминиевой). Намотку ваты, сгибание и стерилизацию проводят так же, как указано для сухих тампонов. Стерильные тампоны перед употреблением смачивают в забуференной смеси путем двукратного погружения в пробирку с жидкостью. После смачивания тампона его помещают в пробирку, а затем используют для взятия материала. Хранить 3 дня в условиях холодильника.

Раствор для смачивания тампонов (по прописи Е.А. Кузнецова)

В конической колбе смешивают 90—95 мл предварительно приготовленного раствора Na_2HPO_4 (11,876 г на 1 л дистиллированной воды) и 5—10 мл раствора KH_2PO_4 (9,078 г на 1 л дистиллированной воды); к этой смеси добавляют 0,5 г агар-агара, стерилизуют при 1 атм. 20 мин. Затем в горячую смесь добавляют 0,2 г активированного угля (навеску угля стерилизуют отдельно). Смесь готовят впрок и хранят в холодильнике до 2 месяцев.

Приложение 3

Приготовление питательных сред с добавками

В качестве питательной среды для посева исследуемого материала применяют картофельно-глицериновый агар (среда Борде-Жангу) и казеиново-угольный агар (КУА). Среды могут быть приобретены и приготовлены согласно инструкции производителя. Для улучшения роста при необходимости в среду можно добавить до автоклавирования активированный уголь (0,5 %) и дрожжевой диализат или экстракт (50 мл на 1 л среды), предварительно нейтрализованный до pH 7,0 (по бромтимоловому синему до зеленого цвета), а также пролин или глютамин (0,03 г на 1 л среды).

Ростовые добавки вносятся в стерилизованную и остуженную до температуры 50 °С среду. Оптимально добавлять в среды дефибринированную лошадиную или баранью кровь: в среду Борде-Жангу – 20 %, в КУА – 10 %. Добавление человеческой крови или эритроцитарной массы дает худшие результаты, их можно частично (5 %) заменить сывороткой крупного рогатого скота (можно также добавить 1 % питательной среды № 199).

Для подавления посторонней микрофлоры при посеве исследуемого материала используют пенициллин или бициллин. Их применяют как при обработке поверхности питательной среды, разлитой в чашки Петри, так и при внесении антибиотика в среду. В мировой практике для этих целей используется цефалексин, который, в отличие от пенициллина, не подавляет рост *B. pertussis* и более эффективен в отношении сопутствующей флоры.

Пенициллин

Для обработки поверхности среды используют антибиотик из расчета 7,5 МЕ, нанося его на поверхность среды шпателем или внося его в КУА, растопленный и остуженный до температуры 50 °С, из расчета 30 МЕ на 100 мл среды.

Пенициллин разводят непосредственно перед взятием материала. Для этого во флакон с антибиотиком добавляют стерильный физиологический раствор для получения основного разведения пенициллина. При содержании во флаконе 500 000 МЕ в него добавляют 1 мл физиологического раствора, а при содержании 1 млн МЕ – 2 мл. Полученное основное разведение антибиотика во флаконе можно хранить в условиях холодильника при 4 °С не более недели. Для получения необходимых для работы концентраций антибиотика 0,1 мл основного разведения из флакона (50 000 МЕ) растворяют в 9,9 мл стерильного физиологического раствора;

1 мл такого раствора содержит 5 000 МЕ на 1 мл. Далее делают разведения до получения 75 МЕ в 1 мл физиологического раствора.

Схема разведения пенициллина или бициллина:

1 пробирка – физиологический раствор 9,9 мл + 0,1 мл основного разведения антибиотика = в 1 мл 5 000 МЕ;

2 пробирка – физиологический раствор 8,5 мл + 1,5 мл раствора из 1 пробирки = в 1 мл 750 МЕ;

3 пробирка – физиологический раствор 4,5 мл + 0,5 мл раствора из 2 пробирки = в 1 мл 75 МЕ.

Из третьей пробирки наносят 0,1 мл (7,5 МЕ) на поверхность питательной среды в каждой чашке, тщательно втирая шпателем.

Раствор из третьей пробирки можно использовать для внесения его внутрь среды. Для этого 4 мл (300 МЕ) антибиотика добавляют на 1 л среды (из расчета 30 МЕ на 100 мл среды). Это же разведение можно использовать для добавления к смачивающим жидкостям из расчета 0,1 мл на 10—12 мл жидкости. Рабочее разведение антибиотика (в последней пробирке) используют только в день приготовления.

Цефалексин используется в концентрации 40 мг/л среды. Он производится как селективная добавка для бордетелл (*Bordetella selective supplement*). Содержимое одного флакона (20 мг цефалексина) асептически растворяется в 2 мл стерильной дистиллированной воды и добавляется к 500 мл стерильной остуженной до температуры 50 °С питательной среды.

Приложение 4

Определение содержания аминного азота

Определение содержания аминного азота в питательных средах проводят методом формольного титрования. Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при pH 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

Реактивы: 1) натрия гидроксид (0,1 моль/л) или раствор соляной кислоты (0,1 моль/л);

2) натрия гидроксид 10 %-й раствор;

3) раствор формалина (40 %-й раствор формальдегида) (ГОСТ 1625—75), перед каждым определением pH формалина доводят до pH 7,0 10 %-м раствором натрия гидроксида.

Ход определения

В стакан вместимостью 50 мл наливают необходимый объем (А) (подготовка проб см. примечания 1 и 2) анализируемого раствора препарата, содержащего 1,5—5,0 мг аминного азота, и доводят общий объем дистиллированной водой до 20 мл. Электроды потенциометра погружают в исследуемый раствор, pH которого доводят до значения 7,0 с помощью раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л) или раствора соляной кислоты (0,1 моль/л). В ходе определения электроды должны все время оставаться погруженными в раствор. К нейтрализованному раствору добавляют 2 мл нейтрального формалина, перемешивают и, не вынимая электроды, титруют содержимое раствором натрия гидроксида (0,1 моль/л) до pH 9,1. При титровании следует использовать бюретку вместимостью 5 мл. Проводят два параллельных измерения. Содержание аминного азота в исследуемом препарате в процентах (X) вычисляют по следующим формулам.

1) Для сухого образца: $X = V \times K \times 1{,}4 \times 100 / C$, где:

V – количество раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л) в миллилитрах, пошедшее на титрование испытуемой пробы от pH 7,0 до 9,1;

K – поправка к титру раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л);

1,4 – количество аминного азота в миллиграммах, эквивалентное 1,0 мл раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л);

C – анализируемая навеска сухого препарата в миллиграммах, содержащаяся в титруемом объеме «А»;

100 – коэффициент пересчета миллиграммов в проценты.

2) Для жидкого образца: $X = V \times K \times 1,4 \times 100 / A \times 1\ 000$, где:

A – количество жидкого образца (мл), взятого на анализ;

100 – коэффициент пересчета миллиграммов в проценты;

1 000 – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы.

Примечание 1.

Для сухих образцов (гидролизаты, экстракты, среды (1,5—4,0 % аминного азота) – «*А*» = 10 мл 1 %-го раствора (анализируемая навеска образца «*С*» составляет соответственно 100 мг).

Примечание 2.

Для жидких гидролизатов низкой степени расщепления (0,1—0,2 % аминного азота) «*А*» = 3 мл; для жидких гидролизатов средней степени расщепления (0,3—0,6 % аминного азота) «*А*» = 1 мл; для жидких гидролизатов высокой степени расщепления (0,7—1,3 % аминного азота) «*А*» = 0,5 мл; для жидких питательных сред (0,08—0,14 % аминного азота) «*А*» = 10 мл; для готовых плотных агаровых сред «*А*» = 3 мл препарата, расплавленного в кипящей водяной бане.

Приложение 5

Проверка качества казеиново-угольного агара

В связи с довольно сложным составом казеиново-угольной среды и большой чувствительностью ее к режиму стерилизации следует периодически проверять качество готовой среды. Для этой цели необходимо пользоваться свежевыделенными культурами коклюшного микроба. В стерильных пробирках делают 8 различных разведений взвеси 2—3-суточной культуры. Густота взвеси в первой пробирке должна соответствовать 5 млрд микробных тел в 1 мл по стандарту мутности для коклюшных микробов. Во 2—6-ю пробирки наливают по 4,5 мл стерильного физиологического раствора, в 7-ю наливают 2 мл и в 8-ю – 1 мл. Поверхность одной или двух чашек Петри с используемой средой делят на 2—4 или 8 секторов (в зависимости от питательной среды): 0,5 мл взвеси из 1-й пробирки переносят стерильной пипеткой во 2-ю пробирку и этой же пипеткой наносят 0,1 мл взвеси на сектор 1. Другой стерильной пипеткой перемешивают содержимое второй пробирки (вдуванием и выдуванием), переносят из нее 0,5 мл в 3-ю пробирку и 0,1 мл наносят на сектор 2 и т. д. Для каждого разведения следует употреблять отдельную стерильную пипетку, перемешивая ею содержимое пробирки. В 8-ю пробирку переносят из 7-й 1 мл взвеси, также перемешивая стерильной пипеткой, и наносят 0,1 мл на сектор 8. Чашку Петри осторожно, крышкой кверху (чтобы капли не слились) ставят в термостат и выдерживают в течение 3—5 суток. Если среда приготовлена правильно, то на первых трех секторах рост имеет вид сплошных бляшек, на секторах 4, 5 и 6 вырастают тесно расположенные колонии, а на секторах 7 и 8 – небольшое количество изолированных колоний. Если нет роста на последних 2 секторах, то средой пользоваться нельзя.

При использовании питательных сред с добавлением крови чашки Петри делят на 2 сектора, а при использовании сухих сред (КУА) с добавлением дрожжевого экстракта – на 4 сектора.

Схема приготовления разведений коклюшной культуры для проверки качества КУА

Номер пробирки	Количество физиологического раствора, мл	Объем вносимой взвеси из предыдущей пробирки, мл	Количество микробов в 1 мл
1	2	3	4
1	1,0	× (исходная взвесь)	5 000 000 000 (5×10^9)
2	4,5	0,5	500 000 000 (5×10^8)

Продолжение табл.

1	2	3	4
3	4,5	0,5	50 000 000 (5×10^7)
4	4,5	0,5	5 000 000 (5×10^6)
5	4,5	0,5	500 000 (5×10^5)
6	4,5	0,5	50 000 (5×10^4)
7	2,0	0,5	10 000 (1×10^4)
8	1,0	1,0	5 000 (5×10^3)

В районных лабораториях ЦГиЭ можно использовать метод проверки качества питательной среды, предложенный Е. А. Кузнецовым. Посев колонии коклюшного микроба производят на $^1/_{16}$ поверхности чашки со средой КУА, разлитой в чашки Петри. Всего проверяют 5—10 колоний. Учет роста культуры проводят через 48 ч. В случае роста культуры по всему сектору – среда хорошего качества; при росте на ½ сектора – замедленный рост коклюшного микроба; рост только на посевной площадке – среда плохая.

Приложение 6

Приготовление сред и реактивов для биохимической идентификации бордетелл

1. Питательный агар с тирозином

К 100 мл дистиллированной воды добавляют 3,5 г сухого питательного агара и 0,1 г тирозина, расплавляют над пламенем горелки, разливают по пробиркам и стерилизуют при 0,5 атм. 20—30 мин.

2. Бульон Хоттингера с мочевиной

К 100 мл бульона Хоттингера pH = 7,0 добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл 1,6 %-го спиртового раствора крезолового красного, стерилизуют текучим паром при 100 °С в течение 15 мин. Посев производят в 1 мл среды петлей, выдерживают 24 ч при 35—37 °С.

3. Приготовление реактивов для определения уреазы (по методу Заксе)

Готовят 2 реактива. Реактив А: 2 г мочевины, 2 мл 96°-го этилового спирта, 4 мл дистиллированной воды. Реактив Б: 1 мл 0,2 %-го спиртового раствора фенол-рота, 0,1 г KH_2PO_4, 0,1 г K_2HPO_4, 100 мл дистиллированной воды, 0,5 г хлористого натра. Реактив А не стерилизуют и хранят при температуре 4—10 °С, реактив Б стерилизуют в автоклаве текучим паром. Перед употреблением смешивают 1 часть реактива А и 19 частей реактива Б.

Приложение 7

Хранение культур бордетелл

Работа с культурами для контроля качества среды

Коклюшная культура, высушенная из замороженного состояния под вакуумом, может храниться неопределенно долгое время при сохранении вакуума в ампуле и при температуре не выше 10 °С. Ампулу с высушенным штаммом вскрывают стерильно над лотком. Верхний конец ампулы нагревают на пламени горелки и снимают парафин, затем кусочком стерильной ваты, смоченным в стерильной воде, осторожно прикасаются к оттянутому концу ампулы так, чтобы получилась небольшая трещина, и той же мокрой ватой обводят вокруг носика ампулы. После образования круговой (или неполностью круговой) трещины легким ударом пинцета удаляют конец ампулы. После вскрытия ампулы в нее стерильно наливают 0,2—0,3 мл стерильного физиологического раствора. После растворения сухого содержимого ампулы его переносят пастеровской пипеткой на чашку с питательной средой и 48—72 ч выращивают при температуре 35—37 °С.

В первых пересевах микробы обладают несколько пониженной жизнеспособностью. Для восстановления полной жизнеспособности требуется 2—3 пассажа на оптимальных питательных средах. Рекомендуется для работы пользоваться культурой после второго или третьего пересева. В дальнейшем коклюшные культуры сохраняют на среде Борде-Жангу или КУА с 10 % крови, пересевая 1 раз в 3—4 недели. Можно пользоваться культурой не более 10 пассажа.

Способы длительного хранения (без пересева)

1. Хранение культур коклюшного микроба в консервирующей смеси (рецепт МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского)

Готовят 2 раствора: 1 – 80 %-й раствор глицерина в буферном физиологическом растворе; 2 – сахарозо-желатиновая среда (10 %-й раствор сахарозы и 1 %-й раствор желатина). Смешивают по 2 мл первого и второго растворов в стерильных агглютинационных пробирках, помещают на дно пробирки 3—4 петли 3-суточной культуры коклюшного микроба и хранят в морозильной камере холодильника или в глубоко морозильной камере при –30 °С под ватно-марлевой пробкой до 1 года. При высевах берут петлей часть материала со дна пробирки и высевают на среду КУА с 3—4 % крови, растирая шпателем.

Приготовление 80 %-го раствора глицерина в буферном физиологическом растворе:

1) приготовление буферного физиологического раствора pH 7,2 (на 8 л):

NaCl – 69 г 200 мг, Na_2HPO_4 – 15 г 360 мг, KH_2PO_4 – 3 г 520 мг растворяют в 8 л дистиллированной воды, автоклавируют при 0,3 атм. в течение 30 мин;

2) 80 %-й раствор глицерина стерилизуют в автоклаве при 1,8 атм. в течение 30 мин.

Приготовление сахарозо-желатиновой среды:

На водяной бане при 55 °С растворить в 300 мл дистиллированной воды 10 г желатина; растворить в 300 мл дистиллированной воды 100 г сахарозы; соединить 1 и 2 растворы, довести дистиллированной водой до 1 л, установить pH 7,0 раствором бикарбоната натрия, стерилизовать текучим паром в автоклаве три дня по 1 ч. Хранить разлитым во флаконы.

2. Хранение культур коклюшного микроба в ***полужидком*** КУА (с кровью и без крови), метод предложен ЦГиЭ г. Москвы

Казеиново-угольный агар готовится по прописи, но агар-агара добавляют 1 г на 1 л среды (0,1 %), разливают по пробиркам (в количестве до 8 мл) и стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин. В полужидкий агар КУА можно добавить стерильную дефибринированную кровь крупного рогатого скота, лошади из расчета 0,5—1 мл на 8 мл среды. Культуру коклюшного микроба засевают в среду, выдерживают в термостате 3—4 дня, а затем без пересева сохраняют в холодильнике или при комнатной температуре в течение 1 мес. При хранении культуры коклюшного микроба на плотной среде КУА ее пересевают через 10—14 дней.

Приложение 8

Журнал по бактериологической диагностике коклюша

№ п/п	Фамилия, имя	№ поликлиники, направляющей исследуемый материал	Адрес ребенка	Детское учреждение, посещаемое ребенком	Кратность обследования (1—2 раза)	Характер тампона	Просмотр чашек (кол-во снятых колоний)		
							72 ч	96 ч	120 ч
						Сухой			
						Влажный			

Продолжение

Образование пигмента при посеве чистой культуры	Микроскопия	Ориентировочная реакция агглютинации				Ферментация мочевины (проба Заксе)	Наличие роста на МПА	Образование пигмента на агаре с тирозином	Бордетелла бронхисептика	
		физиол. раствор	неадсорб. специфич. сыворотки 1 : 10	факторные сыворотки					подвижность	ферментация цитрата натрия на среде Симмонса
				1	14					

Продолжение

Определение серовара коклюшного микроба (агглютинация с сыворотками к факторам)		Результаты исследования
2	3	

Приложение 9

Методика проведения смывов с целью контроля контаминации лаборатории продуктами ПЦР

Назначение

Процедуру рекомендуется проводить в случае получения положительных сигналов при амплификации отрицательных контролей этапов экстракции и ПЦР или планово с необходимой периодичностью в зависимости от интенсивности работы (например, 1 раз в неделю – при ежедневном проведении исследований, но не реже, чем 1 раз в месяц). Взятие смывов проводят в первой половине рабочего дня.

Материалы:

- среда для взятия смывов – ТЕ-буфер (или деионизованная вода),
- палочки с ватными наконечниками (зонды с ватным тампоном),
- наборы реагентов для ПЦР, с которыми работает лаборатория.

Контрольные точки для смывов:

- рабочие и контактные поверхности лабораторного оборудования (автоматические пипетки, центрифуги, микроцентрифуги/встряхиватели, амплификаторы, термостаты, холодильники);
- поверхности лабораторных материалов (штативы, пакеты с реактивами, упаковки расходных материалов, ножницы, пинцеты, маркеры и др.);
- рабочие и контактные поверхности лабораторных столов, боксов, ламинарных шкафов;
- прочие контактные поверхности (ручки дверей, кнопки компьютеров, компьютерные мыши, телефоны, компьютерные столы, прочая лабораторная мебель).

Процедура взятия смывов

1) Надеть перчатки, протереть их салфеткой, смоченной 70 % этиловым спиртом.

2) Отобрать необходимое количество стерильных пробирок, в стерильных условиях в каждую пробирку внести 300 мкл ТЕ-буфера (или деионизованной воды).

3) Промаркировать пробирки в соответствии с названиями контрольных точек.

4) Для взятия смыва с каждой контрольной точки выполнить следующее:

- открыть пробирку, смочить зонд с ватным тампоном в ТЕ-буфере (или деионизованной воде), после чего пробирку закрыть;

• вращательными движениями провести зондом по поверхности объекта (из списка контрольных точек);

• тщательно прополоскать рабочую часть зонда в ТЕ-буфере (или деионизованной воде), отжимая его о стенки пробирки и избегая разбрызгивания раствора;

• удалить зонд в контейнер для отходов.

5) Для взятия смывов с каждой новой контрольной точки использовать отдельный зонд.

6) При взятии смывов с ламинарного шкафа: первоначально открыть переднее стекло, взять смывы с пипеток, оборудования, штативов для наконечников и пробирок, с рабочих поверхностей, затем с ручек и кнопок. Далее закрыть переднее стекло и включить ультрафиолетовое облучение.

7) Пробирки со смывами перенести в зону постановки ПЦР.

Постановка ПЦР

ПЦР-исследование полученных смывов с контрольных точек проводится в обычном порядке по инструкции к набору реагентов, начиная с этапа амплификации ДНК.

Интерпретация результатов

• Результаты анализа смывов считаются достоверными только в случае получения корректных результатов для положительных и отрицательных контролей амплификации в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Контрольные точки, в которых выявлены положительные результаты ПЦР, необходимо подвергнуть обработке веществами, деградирующими ДНК (препараты, содержащие активный хлор, см. МУ 1.3.2569—09), и облучению в ультрафиолетовом спектре.

gost.e-ecolog.ru