4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика холеры

Методические указания
МУК 4.2.2218—07

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны: Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Ю. М. Федоров, Н. Я. Жилина); Федеральным государственным учреждением здравоохранения «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» (Ю. М. Ломов, Б. Н. Мишанькин, Л. С. Подосинникова, Л. Г. Воронежская, И. Я. Черепахина, Т. А. Кудрякова, Б. Л. Мазрухо, Л. М. Смоликова, И. В. Рыжко, Р. И. Цураева, Э. А. Москвитина, Б. П. Голубев, С. О. Водопьянов, Е. В. Монахова, В. Д. Кругликов, Н. Р. Телесманич, А. Б. Мазрухо, В. В. Агафонова); Федеральным государственным учреждением здравоохранения «Противочумный Центр» (А. А. Кюрегян, С. М. Иванова, Ю. С. Королев); Федеральным государственным учреждением здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (А. К. Адамов, З. В. Малыхина, Т. В. Бугоркова, Н. И. Смирнова, Л. Ф. Ливанова; А. В. Топорков, С. И. Заднова, Н. А. Осина, Е. С. Казакова, Н. Б. Челдышева, А. В. Осин); Федеральным государственным учреждением здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» (А. С. Марамович, В. С. Ганин, Л. Я. Урбанович, В. И. Погорелов, Л. В. Миронова, Е. С. Куликалова); Федеральным государственным учреждением здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» (В. Н. Савельев); Федеральным государственным учреждением здравоохранения «Причерноморская противочумная станция» (Г. В. Гальцева); Государственным Центром по антибиотикам (С. В. Сидоренко); Российской медицинской академией последипломного образования (Е. А. Ведьмина); ГИСК им. Л. А. Тарасевича (Т. И. Анисимова, Л. В. Саяпина).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 31 мая 2007 г.

3. Введены взамен методических указаний «Лабораторная диагностика холеры» МУ 4.2.1097—02.

Содержание

1. Область применения 82
2. Нормативные ссылки 82
3. Характеристика возбудителя холеры 83
4. Организация лабораторных исследований 83
4.1. При осуществлении эпидемиологического надзора 84
4.2. При проведении противоэпидемических мероприятий 85
5. Бактериологическое исследование 85
5.1. Отбор и доставка материала на исследование 86
5.2. Порядок исследования 88
5.3. Идентификация культур холерных вибрионов 95
5.4. Учет анализов, оформление направлений и выдача результатов 104
6. Методы изучения свойств холерных вибрионов 106
6.1.Серологические методы 106
6.2. Биохимические свойства 108
6.3. Выявление способности к биолюминесценции 110
6.4. Тесты дифференциации биоваров холерных вибрионов О1 110
6.5. Тесты межвидовой дифференциации патогенных для человека вибрионов 111
6.6. Оценка эпидемической значимости холерных вибрионов 112
6.7. Оценка антибиотикочувствительности 115
7. Питательные среды, реактивы, консерванты. Порядок контроля качества питательных сред 126
7.1. Питательные среды 126
7.2. Реактивы 130
7.3. Консерванты для сохранения дефибринированной крови 130
7.4. Порядок контроля качества питательных сред 131
8. Методы серологической диагностики 132
8.1. Определение аглютининов в сыворотке крови 128
8.2. Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови (РВА) 134
8.3. Определение токсиннейтрализующих антител в сыворотке крови 136
Приложение 1. Направление проб от людей 137
Приложение 2. Направление проб из объектов окружающей среды 138
Приложение 3. Укладка для отбора материала от больного с подозрением на холеру для больничного учреждения неинфекционного профиля, станций скорой и неотложной помощи, поликлиник, СКО, СКП, ПСКП 139
Приложение 4. Укладка для забора проб из объектов окружающей среды на холеру 140
Приложение 5. Способ отбора колоний вибрионов с помощью стереоскопического микроскопа в косо проходящем свете 141
Приложение 6. Журнал регистрации микробиологических исследований материала от больных (трупов) людей с подозрением на холеру и другие карантинные инфекции 143
Приложение 7. Журнал регистрации микробиологических исследований проб из объектов окружающей среды 143
Приложение 8. Журнал идентификации культур холерных вибрионов 144
Приложение 9. Журнал учета выделенных штаммов микроорганизмов (форма № 513/у) 145
Приложение 10. Паспорт штамма. Характеристика штамма 146

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко
31 мая 2007 г.
Дата введения: 1 августа 2007 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика холеры

Методические указания
МУК 4.2.2218—07

---

1. Область применения

1.1. Методические указания «Лабораторная диагностика холеры» разработаны для внедрения и применения действующих нормативных документов, определяющих требования к эпидемиологическому надзору за холерой в части, касающейся организации и проведения лабораторной диагностики холеры.

1.2. Настоящие методические указания предназначены для специалистов бактериологических лабораторий учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, лечебно-профилактических и противочумных учреждений.

2. Нормативные ссылки

2.1. Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционной заболеваемости человека I—IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами. СП 1.3.1318—03».

2.2. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности. СП 1.3.1285—03».

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

2.4. Санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами. СП 1.2.731—99».

2.5. Санитарные правила «Условия транспортировки и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. СП 3.3.2.028—95».

2.6. Методические указания «Организация работ при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности. МУ 1.3.1794—03».

2.7. Санитарные правила «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору. СП 3.1.1086—02».

3. Характеристика возбудителя холеры

Холера – острая инфекционная болезнь с диарейным синдромом, фекально-оральным механизмом заражения, пищевым, водным и контактно-бытовым путями распространения возбудителя. Относится к группе инфекций, борьба с которыми регламентируется Международными медико-санитарными правилами (2005).

Возбудителями холеры являются холерные вибрионы О1 (классического и эльтор биоваров) и О139 серогрупп.

Токсигенные (ctx^+) холерные вибрионы обеих серогрупп вызывают заболевание холерой, склонное к эпидемическому и пандемическому распространению (эпидемически значимые штаммы), нетоксигенные (ctx^-) – единичные или групповые заболевания холерой при общем источнике заражения.

У нетоксигенных (ctx^-) штаммов холерных вибрионов возможно присутствие отдельных генов патогенности, среди которых определенную значимость имеет ген tcp, участвующий в реализации процесса адгезии.

Характеристика генома выделенных холерных вибрионов биологическими методами широко используется для эпидемиологического анализа и оценки эпидемической значимости выделенных штаммов.

4. Организация лабораторных исследований

Диагностические исследования на холеру в регламентированном объеме могут проводить:

- бактериологические лаборатории учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, лечебно-профилактических и противочумных учреждений, имеющие разрешение на работу с микроор-ганизмами III группы патогенности;
- лаборатории особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора и ведомств, имеющие разрешение на проведение диагно-стических исследований на холеру;
- лаборатории противочумных учреждений, имеющие разрешение на проведение диагностических исследований на холеру и на работу с возбудителем холеры.

Организация и выполнение диагностических исследований на холеру в лабораториях должны осуществляться в соответствии с требованиями, регламентирующими:

- безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности – для бактериологических лабораторий учреждений, осуществляющих государст-венный санитарно-эпидемиологический надзор, и лечебно-профилактических учреждений;
- безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности – для лабораторий (отделов) особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, ведомств и противочумных учреждений;
- порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов IV группы патогенности.

Порядок получения лабораториями разрешения на диагностические исследования на холеру определяется действующими нормативными документами о порядке выдачи разрешений на эти виды работ.

В условиях осложнения эпидемиологической обстановки временное разрешение на проведение диагностических исследований на холеру бактериологическим

лабораториям учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, и другим, функционирующим в составе лабораторной службы очага, в случае расширения их функциональных обязанностей представляется решением медицинского штаба очага.

4.1. При осуществлении эпидемиологического надзора

4.1.1. Бактериологические лаборатории учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, и лечебно-профилактические учреждения проводят плановые диагностические исследования на холеру материала от больных острыми кишечными инфекциями, определенного контингента здоровых лиц и проб из объектов окружающей среды в объеме, предусмотренном действующими нормативными документами по эпидемиологическому надзору за холерой.

Исследования ведут до установления отрицательного результата анализа или до выделения культуры с характерным для вибрионов ростом на агаровой и полиуглеводной средах и положительной реакцией на оксидазу. Культуры проверяют на чистоту в мазке, окрашенном по Граму, на подвижность и в реакции агглютинации на стекле (далее слайд-агглютинации) с холерными сыворотками О1, Огава, Инаба, РО и О139.

При положительном результате слайд-агглютинации немедленно сообщают в органы Роспотребнадзора в субъекте Российской Федерации, культуру для окончательной идентификации немедленно доставляют в специализированную лабораторию в установленном порядке.

При отрицательном результате слайд-агглютинации:

- неагглютинирующиеся холерными сыворотками О1 и О139 культуры, выделенные от людей, направляют для дальнейшей идентификации в специализированную лабораторию;
- неагглютинирующиеся холерными сыворотками О1 и О139 культуры, выделенные из объектов окружающей среды, идентифицируют на месте или по согласованию передают в учреждение Роспотребнадзора.

4.1.2. Лаборатории особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора и ведомств:

- выполняют диагностическое исследование материала от больных и умерших с подозрением на холеру и проб из объектов окружающей среды;
- идентифицируют культуры вибрионов, выделенных в территориальных и ведомственных лабораториях, определяя их таксономическую принадлежность, а также определяют эпидемическую значимость (токсигенность) и антибиотикочувствительность холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп по регламентированным для этих лабораторий тестам;
- осуществляют (или организуют) бактериологический контроль качества питательных сред и других диагностических препаратов, используемых в территориальных лабораториях;
- представляют оперативную информацию о выделении культур холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп;
- в установленном порядке немедленно передают в территориальное противочумное учреждение культуры холерных вибрионов, таксономическая принадлежность или токсигенность которых имеющимися средствами диагностики не определяется;
- в течение 5 дней после окончания идентификации передают в территориальное противочумное учреждение или в головной по проблеме «Холера» Ростовский-на-

Дону научно-исследовательский противочумный институт все культуры холерных вибрионов О1, О139, независимо от объекта обследования, и других серогрупп при выделении от больных;

• контролируют деятельность территориальных лабораторий, оказывают им методическую помощь по всем вопросам лабораторного обеспечения эпидемиологического надзора за холерой.

4.1.3. Лаборатории противочумных учреждений:

• проводят исследования материала от больных и умерших с подозрением на заболевание холерой, а также проб из объектов окружающей среды;

• подтверждают таксономическую принадлежность культур холерных вибрионов, выделенных на курируемой территории;

• идентифицируют все атипичные культуры холерных вибрионов с использованием дополнительных методов серологической, биохимической и других видов идентификации с целью уточнения таксономической принадлежности;

• определяют эпидемическую значимость (токсигенность) и антибиотикочувствительность культур;

• осуществляют методическое руководство по всем вопросам лабораторного обеспечения эпидемиологического надзора за холерой на курируемой тер-ритории;

• в установленном порядке выделенные культуры холерных вибрионов с паспортами передают в территориальный противочумный институт, головной по проблеме «Холера» Ростовский-на-Дону научно-исследовательский про-тивочумный институт, одновременно паспорта на эти же культуры направляют в противочумный центр Роспотребнадзора.

Лабораторное обеспечение эпидемиологического надзора за холерой осуществляют в соответствии с действующими нормативными и методическими документами. Профилактические исследования на холеру проводят в течение рабочего дня с использованием соответствующих питательных сред, диагностические исследования материала от подозрительных на холеру больных (трупов) – в условиях круглосуточного режима работы лаборатории.

4.2. При проведении противоэпидемических мероприятий

Организация и регламентирование деятельности лабораторий, а также формирование лабораторной службы в очаге холеры осуществляются в соответствии с действующими нормативными документами по организации и проведению противохолерных мероприятий.

5. Бактериологическое исследование

В системе противохолерных мероприятий значительное место занимает бактериологический анализ, от правильности и своевременности проведения которого зависит характер и объем профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Исследования проводят с целью:

• выявления больных холерой и вибриононосителей;

• установления окончательного диагноза при вскрытии трупов лиц, умерших от подозрительного на холеру заболевания;

• обоснования выбора средств этиотропной терапии холеры;

• бактериологического контроля эффективности лечения больных холерой и вибриононосителей;

• бактериологического контроля объектов окружающей среды, в том числе поверхностных водоемов;

• бактериологического контроля эффективности обеззараживания в очаге инфекции.

5.1. Отбор и доставка материала на исследование

Материалом для бактериологического анализа могут служить испражнения, рвотные массы, желчь, трупный материал (отрезки тонкого кишечника и желчный пузырь); предметы, загрязненные испражнениями (постельное и нательное белье и др.); вода, ил, гидробионты, сточные воды, содержимое выгребных туалетов; смывы с объектов окружающей среды, пищевые продукты, мухи и др.

Материал от больного забирает медицинский персонал лечебного учреждения, немедленно после выявления больного и до начала лечения антибиотиками. Руководитель является ответственным за правильность отбора, хранения и своевременность доставки проб в лабораторию.

Необходимо учитывать высокую чувствительность холерных вибрионов к дезинфицирующим средствам и кислотам, возможность антагонистического действия сопутствующей микрофлоры и предполагаемую концентрацию возбудителя в исследуемом материале. Если в материале от больных алгидной формой холеры концентрация возбудителя достигает 10^6—10^9 м.к./мл, то в испражнениях больных легкой формой и леченных антибиотиками, реконвалесцентов и носителей количество холерных вибрионов обычно не превышает 10^2—10^4 м.к./г.

Для отбора проб используют чистую стерильную посуду, не содержащую следов дезинфицирующих растворов. Стерилизацию посуды и других средств забора материала проводят автоклавированием, сухим жаром или кипячением в 2 %-м растворе пищевой соды.

Материал для исследования должен быть доставлен не позже, чем через 2 ч после его взятия. В случае удлинения сроков доставки используют транспортные среды. Наиболее удобной и достаточно эффективной является 1 %-я пептонная вода (pH 8,4 ± 0,1).

В пептонную воду в качестве ингибитора сопутствующей флоры может быть добавлен теллурит калия из расчета 1 : 100 000—1 : 200 000 или моющее средство «Прогресс» в концентрации 0,1—0,2 %. В отдельных случаях для транспортирования материала могут быть использованы солевые консерванты (см. раздел 7).

На флаконах (пробирках) с пептонной водой, передаваемых в стационары для отбора проб, должна быть этикетка или надпись с указанием названия среды и даты ее приготовления.

Среды во флаконах или пробирках, закрытых ватно-марлевыми пробками, рекомендуется хранить не более 2-х суток при температуре не выше (10,0 ± 0,2) °С при условии сохранения их стерильности. Целесообразно обеспечение стационаров и групп забора проб средами в закатанных флаконах.

При наличии у больного диареи материал забирают до начала этиотропной терапии в количестве 10—20 мл, у больных легкими формами – 1—2 г испражнений. От больных тяжелой формой материал направляют в лабораторию нативным и в 1 %-й пептонной воде. В транспортную среду вносят 1—2 мл или 1—2 г материала на 5—6 мл среды.

При вынужденном удлинении сроков доставки материала в лабораторию (длительное плавание, круиз и т. п.) можно использовать полоски фильтровальной (промокательной) бумаги. Жидкими испражнениями пропитывают полоску обычной плотной

промокательной бумаги или другого гигроскопичного материала и герметично упаковывают в пластиковый пакет для предохранения от высыхания при транспортировании в лабораторию. На таких полосках холерные вибрионы выживают до четырех-пяти или более недель, пока сохраняется влага.

При обследовании на вибриононосительство материал забирает медицинский персонал лечебно-профилактических учреждений, в очаге создают специальные группы по отбору проб, работающие под руководством эпидемиологов.

Материал в количестве 1—2 г может быть доставлен на исследование нативным, в 1 %-й пептонной воде или другой транспортной среде.

5.1.1. Способы отбора проб от больных холерой, вибриононосителей и контактных с ними лиц, секционного материала

Испражнения и рвотные массы в количестве 10—20 мл собирают в стерильную посуду стерильными ложками или стеклянными трубками с резиновой грушей из индивидуального судна, на дно которого помещают меньший по размеру сосуд (лоток), удобный для обеззараживания кипячением.

Для взятия материала у больных с обильным водянистым стулом можно использовать резиновый катетер, один конец которого вводят в прямую кишку, а другой опускают в банку. Жидкие испражнения стекают в сосуд свободно или при легком массаже брюшной стенки.

Стерильный ректальный ватный тампон из гигроскопической ваты вводят в прямую кишку на глубину 5—6 см, собирают им содержимое со стенок кишечника и опускают во флакон или пробирку с 1 %-й пептонной водой.

Стандартную стерильную петлю из алюминиевой проволоки перед забором материала смачивают стерильным 0,9 %-м раствором натрия хлорида и вводят в прямую кишку на 5—6 см. Взятый материал переносят во флакон или пробирку с 1 %-й пептонной водой.

Желчь берут при дуоденальном зондировании в лечебном учреждении. В отдельные пробирки собирают две порции: из желчного пузыря и желчных протоков (В и С). Материал доставляют нативным.

От умерших с подозрением на холеру берут отрезки (длиной около 10 см) верхней, средней и нижней частей тонкой кишки, разрез производят между двойными лигатурами, предварительно наложенными на оба конца изымаемого участка кишечника. Желчный пузырь после перевязки протока извлекают целиком. Содержимое кишечника и желчь от трупа можно взять стерильным шприцем с толстой иглой в объеме до 10 мл и перенести в емкость с 1 %-й пептонной водой. Взятые образцы органов трупа укладывают раздельно в стерильные банки.

Банки, пробирки с материалом закрывают непромокаемыми пробками и пергаментной бумагой, тщательно обрабатывают снаружи салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором, избегая затекания его внутрь. Все пробы этикетируют, укладывают в специально подготовленную для транспортирования металлическую тару и перевозят на служебном транспорте с сопровождающим. Форма направления дана в прилож. 1.

5.1.2. Отбор проб из объектов окружающей среды

Воду (питьевую, из поверхностных водоемов и др.) для исследования берут в количестве 1 л на одну пробу в двух объемах по 500 мл в стерильную посуду с непромокаемой пробкой.

Из водопроводных кранов пробы воды берут после предварительного обжигания их спиртовым факелом и спуска воды в течение 10 мин при полном открытии крана.

Хозяйственно-бытовые сточные воды отбирают для исследования двумя способами: в объеме 1 л в двух емкостях по 500 мл или тампонами, приготовленными из марлевых салфеток размером 10 × 10 см, сложенных в 10—15 слоев. Последние закрепляют у места забора воды, через сутки помещают в стерильную банку и доставляют в лабораторию.

Гидробионтов (рыб, лягушек и др.) отлавливают из водоемов любым способом и в закрытых банках, ведрах и других сосудах доставляют в лабораторию.

Ил и фитопланктон (водоросли) также помещают в стерильные банки и транспортируют в лабораторию.

Исследовать зоопланктон (дафнии, циклопы и др.) можно групповым методом, объединяя в один посев 10—30 образцов, отловленных на одном участке водоема. В этом случае они могут быть доставлены в одном сосуде. При исследовании рыб берут содержимое желудка и жабры.

Смывы с различных объектов окружающей среды берут ватным или марлевым тампоном, смоченным 0,9 %-м раствором натрия хлорида, с поверхности площадью 10 х 10 см. Тампон опускают во флакон или пробирку с 1 %-й пептонной водой.

Для сбора мух расставляют мухоловки, в которые наливают 1 %-ю пептонную воду с 1 % сахара.

Остатки пищи в очаге и по показаниям пищевые продукты отбирают по 200 г плотных и 0,5 л жидких, помещают в стеклянную посуду и закрывают. При необходимости в жидкие продукты добавляют основной пептон до 1 %-й концентрации.

Пробы объектов окружающей среды этикетируют, заполняют направление (прилож. 2) и отправляют в лабораторию с нарочным согласно действующим СП.

Перечень предметов, входящих в укладки для отбора проб, см. в прилож. 3, 4.

5.2. Порядок исследования

При бактериологическом исследовании на холеру используют различные питательные среды: жидкие среды обогащения, щелочной агар, элективные дифференциально-диагностические среды и набор сред для идентификации.

Применяют сухие среды производственного выпуска, имеющие номера госрегистрации и лицензии, или среды, консерванты, приготовленные по рецептуре и технологии, изложенной в разделе 7. Используемые для диагностики холеры питательные среды подлежат бактериологическому контролю в установленном порядке.

Агаровые среды перед использованием должны быть тщательно подсушены. Посев делают так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Все посевы инкубируют при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

Посевы исследуемого материала на всех этапах выращивают в 1 %-й пептонной воде 6—8 ч, в пептонной воде с теллуритом калия – 12—18 ч, на щелочном агаре – не менее 14—16 ч, а на плотных элективных средах – 18—24 ч. Теллурит калия следует добавлять в 1 %-ю пептонную воду с pH не ниже 8,3 ± 0,1, до внесения исследуемого материала. Продолжительность хранения рабочего раствора теллурита калия (1 : 1 000) – 7 дней, а питательных сред с теллуритом калия – не более 2-х суток при условии содержания их в холодильнике.

5.2.1. Исследование проб от больных и вибриононосителей, секционного материала (рис. 1)

I этап

Испражнения, рвотные массы больных, а также содержимое кишечника, желчного пузыря и суспензию кусочков слизистой тонкого кишечника трупа в объёме 0,5—1,0 мл засевают пипеткой в 50—100 мл накопительной среды, петлей – на щелочной агар и одну из элективных сред (СЭДХ, TCBS).

При исследовании материала от больных с подозрением на заболевание холерой не допускается использование в качестве накопительной среды 1 %-й пептонной воды с теллуритом калия.

В случае поступления материала от больных с подозрением на холеру могут быть использованы ускоренные методы исследования: иммунолюминесцентный, иммобилизация и ПЦР со специфическими праймерами (см. раздел 6) на первом, втором и последующих этапах исследования.

Материал от подозреваемых на вибриононосительство засевают в 50 мл среды накопления при индивидуальных анализах и в 100 мл – при групповых, объединяя в один флакон по 0,5—1,0 мл пробы не более чем от 5 человек. К групповым посевам прибегают в редких случаях при проведении массовых обследований на вибриононосительство.

Материал, доставленный в 5 мл 1 %-й пептонной воды, полностью используют для посева в 50 мл среды накопления. В случае поступления в лабораторию материала, забранного в 50 мл 1 %-й пептонной воды во флаконе, и доставки его не позже 2-х ч после забора пробы, флакон помещают в термостат на 6 ч для накопления возбудителя. При доставке материала в более поздние сроки 5 мл его засевают в 50 мл 1 %-й пептонной воды.

В отдельных случаях, при бактериологическом исследовании материала от лиц, принимавших антибиотики, активные по отношению к возбудителю холеры, его засевают в 200—300 мл 1 %-й пептонной воды (предпочтительно в широкогорлые колбы) и на 2 чашки щелочного агара так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 ч, производя последовательные высевы через 8—10 ч инкубации с поверхностного слоя среды на пластинки щелочного агара. Использование второй среды обогащения в этом варианте исследования нецелесообразно.

II этап (через 6—8 ч от начала исследования)

С первой среды накопления делают высев на щелочной агар и одну из элективных сред и в 5—8 мл второй среды накопления. Пересевы в жидкие и на плотные среды делают с поверхности жидкой среды большой бактериологической петлей диаметром 5 мм.

При отрицательных результатах исследования нативного материала ускоренными методами их повторяют после 6 ч инкубации первой среды накопления.

III этап (через 12—16 ч от начала исследования)

Высев со второй среды накопления на щелочной агар.

В случае необходимости ускорения хода анализа материала от больного, подозрительного на заболевание холерой, отбор колоний со щелочного агара, засеянного в начале исследования, можно начинать уже на этом этапе, в остальных случаях – на следующем.

IV этап (через 18—24 ч от начала исследования)

Отбор подозрительных на холерный вибрион колоний в посевах на плотные среды нативного материала, а также в высевах из 1-й и 2-й накопительных сред.

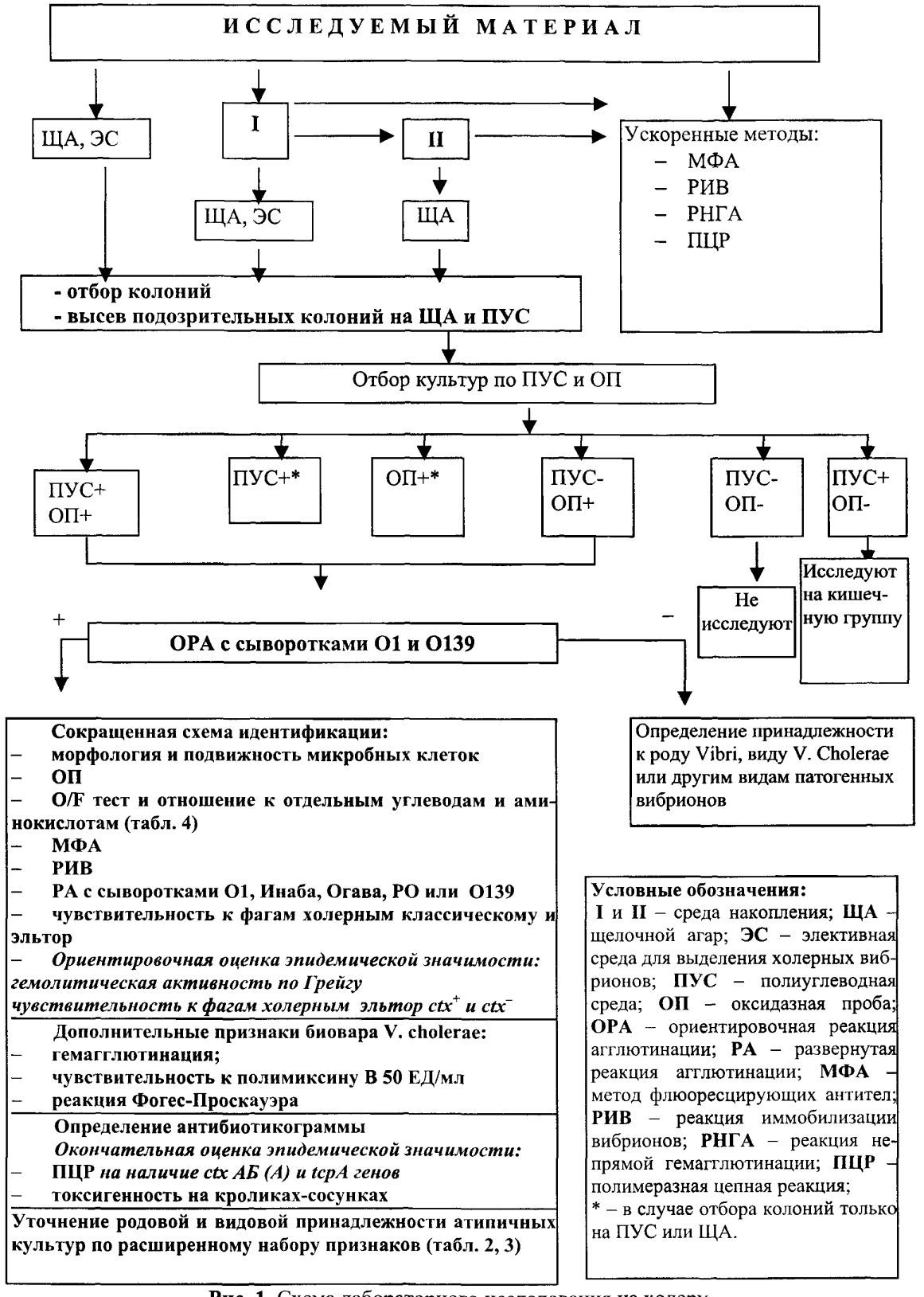


Рис. 1. Схема лабораторного исследования на холеру

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

На щелочном агаре колонии холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп в типичной S-форме – круглые, гладкие, плоские, голубоватые, гомогенные, с ровными краями, прозрачные в проходящем свете и светло-серые с голубым или зеленоватым оттенком под стереоскопическим микроскопом в косо проходящем свете (прилож. 5).

Колонии холерных вибрионов на элективных средах TCBS и СЭДХ имеют яркожелтую окраску на зеленом или синем фоне среды, полупрозрачные. Размеры колоний на щелочном агаре через 10—12 ч инкубации обычно не превышают 1 мм, а к 18—24 ч достигают 2—3 мм в диаметре. Темпы формирования колоний холерных вибрионов на элективных средах несколько замедлены, поэтому просмотр посевов на СЭДХ или TCBS следует проводить не ранее чем через 18—20 ч инкубации, когда размеры их становятся близки к колониям, вырастающим на щелочном агаре.

В отдельных случаях в посевах могут также встречаться атипичные колонии: мутные с плотным центром, пигментированные (коричневые или светло-желтые), мельчайшие коккоподобные, шероховатые. Следует иметь в виду, что состав и качество питательных сред оказывают влияние на величину и плотность колоний холерных вибрионов, а также на морфологию клеток.

б) При отборе колоний можно использовать пробу на индофенолоксидазу с однокомпонентным реактивом (без альфа-нафтола) с индикаторными бумажками из набора СИБ-1 для идентификации вибрионов или – тест-системы ОКСИ-тест. С колониями, обнаруженными на элективных средах, пробу на оксидазу ставить не рекомендуется.

в) Подозрительные колонии проверяют в слайд-агглютинации с сывороткой холерной О1 в разведении 1 : 50—1 : 100. При положительной реакции и достаточном количестве подозрительных колоний ставят слайд-агглютинацию с вариантоспецифическими сыворотками Инаба и Огава в том же разведении, приготавливают мазки для окраски по Граму и обработки флюоресцирующими иммуноглобулинами. При отрицательных результатах колонии, обнаруженные в посевах материала от больных, проверяют в слайд-агглютинации с холерными сыворотками О139 и РО.

Положительная ориентировочная реакция агглютинации с холерной О1 сывороткой в разведении 1 : 100 и вариантоспецифической в разведении 1 : 50 или положительная реакция с флюоресцирующими иммуноглобулинами в сочетании с морфологическими, культуральными признаками и специфической иммобилизацией позволяют выдать на соответствующем этапе предварительный ответ об обнаружении в исследуемом материале холерного вибриона О1, а в случае положительной реакции с сывороткой О139 – холерного вибриона О139 серогруппы.

г) Подозрительные на вибрионы колонии, агглютинирующиеся и не агглютинирующиеся холерными О1 и О139 сыворотками, отсевают на одну из полиуглеводных сред (лактозо-сахарозная, Ресселя, Клиглера, маннозо-сахарозная или др.) и (или) на сектор пластинки щелочного агара для выделения чистой культуры, ее идентификации и определения чувствительности к антибиотикам.

V этап (через 24—36 ч от начала исследования)

Отбор культур для идентификации

На полиуглеводных средах отбирают культуры с типичными для вибрионов характером роста и изменениями:

- на двууглеводных средах (лактозо-сахарозная, глюкозо-лактозная и Клиглер) наблюдается характерное для кислой реакции изменение цвета столбика при сохране-

нии цвета скошенной части без образования газа, а также сероводорода, продуцируемого в среде Клиглера, отдельными штаммами за счет расщепления серосодержащихся компонентов;

• в маннозо-сахарозной среде за счет ферментации обоих углеводов окрашиваются и столбик, и скошенная часть, а также в отдельных случаях улавливается образование сероводорода.

Культуры, выросшие на щелочном агаре, проверяют на наличие индофенолоксидазы.

Определяют морфологию микроорганизмов и чистоту отобранных культур, выросших на щелочном агаре и полиуглеводных средах, с помощью окрашенных по Граму мазков.

Культуры, дающие характерные изменения на полиуглеводных средах и положительные в пробе на оксидазу, проверяют в ориентировочной слайд-агглютинации с холерными сыворотками О1 в разведении 1 : 100, РО, Инаба и Огава – в разведении 1 : 50. При отрицательных результатах с этими сыворотками ставят слайд-агглютинацию с холерной сывороткой О139 серогруппы, используя ее в соответствии с инструкцией по применению.

На основании положительных результатов агглютинации с сыворотками О1, Инаба или/ и Огава выдают предварительный положительный ответ о выделении из исследуемого материала культуры холерного вибриона О1 соответствующего серовара.

Если выделенная культура реагирует с холерной сывороткой О139 при отрицательных результатах с сыворотками О1 серогруппы, выдают ответ о выделении холерного вибриона О139 серогруппы.

Проводят идентификацию выделенных на полиуглеводных средах или на щелочном агаре агглютинирующихся и не агглютинирующихся сыворотками О1, РО или О139 серогрупп оксидазопозитивных культур по сокращенной или полной схеме, не агглютинирующихся холерными О1, РО и О139 сыворотками – до определения вида с учетом основных родовых признаков.

VI этап (через 36—48 ч от начала исследования)

Учитывают результаты идентификации и выдают окончательный ответ о выделении культуры холерного вибриона соответствующей серогруппы и биовара.

Для холерных вибрионов О1 эпидемическую значимость ориентировочно оценивают по тестам гемолитической активности и чувствительности к фагам эльтор ctx^+ и ctx^-, а в специализированных учреждениях – окончательно по результатам ПЦР или генетического зондирования на присутствие в геноме выделенной культуры ctx AB (A) гена, а также токсигенности на модели кроликов-сосунков. Эпидемическую значимость холерных вибрионов О139 серогруппы определяют по тем же тестам, кроме чувствительности к фагам эльтор ctx^+ и ctx^-. К окончанию этого этапа исследования должна быть определена антибиотикочувствительность выделенной культуры.

При выделении от больного или вибриононосителя культуры холерного вибриона, не агглютинирующейся холерными сыворотками О1 и О139, выдают ответ о выделении холерных вибрионов не О1 и не О139. При наличии вибрионных агглютинирующих диагностических сывороток определяют принадлежность к другим серогруппам (О2—О83).

Идентификацию культур, агглютинирующихся РО-сывороткой, см. в разделе 5.3.

5.2.2. Исследование объектов окружающей среды

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

а) *Вода поверхностных водоемов и водопроводная*

В зависимости от времени доставки пробы возможны следующие варианты посевов с целью первичного накопления вибрионов:

- к исследуемой воде добавляют раствор основного пептона до 1 %-й концентрации, определяют pH, в случае необходимости подщелачивают 10 %-м раствором едкого натрия до pH 8,4 ± 0,1. Время инкубации в 1-й среде накопления – 8—10 ч. Объем 2-й среды накопления – 10 мл; время инкубации в среде без теллурита калия – 6 ч, а с теллуритом калия –18—20 ч;
- в исследуемую воду добавляют раствор основного пептона до 1 %-й концентрации и теллурит калия из рабочего разведения 1 : 1 000 до концентрации 1 : 100 000 или 1 : 200 000 в соответствии с данными проверки. Устанавливают pH 8,4 ± 0,1. Время инкубации 18—24 ч; вторая среда накопления – 10 мл среды без теллурита калия, время инкубации 6—8 ч;
- исследование проб воды можно также проводить с использованием в качестве ингибитора посторонней флоры моющего средства «Прогресс» в концентрации 0,1—0,2 %; после добавления основного раствора пептона до 1 %-й концентрации и установления щелочной реакции пробы сохраняют при комнатной температуре (не выше 25 °С) до утра (первая среда накопления). В начале следующего дня засевают 5 мл поверхностного слоя в 100 мл 1 %-й пептонной воды (вторая среда накопления) и делают высев на щелочной агар; высев со второй среды накопления производят через 6—8 ч инкубации;
- воду фильтруют через мембранные фильтры № 2 или 3, смыв с которых сеют в накопительную среду и на агаровые пластинки. Из смыва с фильтра можно делать мазки для окраски флюоресцирующими холерными иммуноглобулинами, а также ставить РНГА, ПЦР со специфическими праймерами.

При интенсивном бактериальном загрязнении проб можно использовать III среду накопления.

б) *Хозяйственно-бытовые сточные воды*

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

После добавления к пробам основного раствора пептона до 1 %-й концентрации устанавливают pH 8,4 ± 0,1 и инкубируют в объемах по 500 мл 8—10 ч (1 среда накопления) или с добавлением теллурита калия 1 : 100 000 (1 : 200 000) – 18—24 ч.

При заборе сточных вод марлевыми тампонами последние помещают в широкогорлые колбы или банки с накопительной средой (500 мл) и далее исследуют, как указано выше.

в) *Гидробионты*

Лягушку непосредственно перед исследованием обездвиживают уколом иглы в спинной мозг и фиксируют на препаровальной доске брюшком вверх. Поверхность брюшка обрабатывают спиртом и ножницами делают медиальный разрез. Желчный пузырь отсекают от печени, разрезают и делают отпечаток на пластинке щелочного агара. Остатки желчи вместе с желчным пузырем помещают во флаконы с 50—100 мл 1 %-й пептонной воды. Содержимое желудка засевают в 1 %-ю пептонную воду, а внутренней поверхностью стенки делают отпечатки на агаровые пластинки. Посев кишечника делают таким же образом, отсекая несколько петель в верхнем, среднем и нижнем отделах кишечника.

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

ножницами по 10—20 экз. в одной пробе и делают посев суспензии петлей на чашку с агаром и в 1 %-ю пептонную воду.

Дафний, циклопов и других рачков, так же, как и фитопланктон, растирают в ступке и засевают петлей в 1 %-ю пептонную воду.

У раков исследуют кишечник и жабры, делая посев содержимого в среду накопления и слизистой стенки – отпечатком на агаровую среду.

г) *Пищевые продукты*

Безалкогольные напитки исследуют тем же методом, что и воду.

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

Из твердых пищевых продуктов берут навеску 25 г, растирают в стерильной ступке с 2—3 г кварцевого песка и физиологическим раствором, а затем переносят в 125 мл накопительной среды и петлей на агаровые среды.

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

После посева продукта устанавливают pH среды 8,4 ± 0,1.

д) *Смывы с объектов внешней среды и мух* засевают в 1 %-ю пептонную воду и исследуют по обычной схеме.

5.2.3. Порядок исследования в условиях односменной работы лаборатории

При осуществлении эпиднадзора за холерой исследование материала от обследуемых контингентов может выполняться в следующих вариантах.

а) В качестве 1-й или 2-й среды накопления используют 1 %-ю пептонную воду (pH 8,4 ± 0,1) с теллуритом калия в конечной концентрации 1 : 100 000—1 : 200 000 в соответствии с результатами его контроля.

Вопрос выбора транспортной среды и порядок исследования решают в зависимости от разницы времени с момента взятия пробы до поступления ее в лабораторию. Примерная схема забора материала от больных в 1 %-ю пептонную воду и порядок дальнейшего его исследования на холеру с учетом различного времени доставки в лабораторию представлены в табл. 1. В течение рабочей недели для отбора проб используют 1 %-ю пептонную воду без теллурита калия в объеме 5—10 мл, во флаконах или пробирках (транспортная среда).

Пробы до отправки в лабораторию сохраняют при комнатной температуре (24,0 ± 1,0) °С в биксах, ящике, шкафу и т. д. в специально выделенной комнате, закрывающейся на замок. Продолжительность сохранения проб в указанных условиях – до 24 ч.

В случаях, когда температура в помещении превышает 25 °С, материал следует брать в 1 %-ю пептонную воду с теллуритом калия.

В лаборатории в пробы во флаконах доливают соответствующую среду накопления до 50 мл, а из пробирок все 5—10 мл транспортной среды с материалом переносят пипеткой в 50 мл среды накопления.

На период выходного дня лаборатории в порядке исключения допускается следующий вариант: забор материала в 50 мл 1 %-й пептонной воды с теллуритом калия (транспортная среда); допускаемое время сохранения проб до начала исследования при температуре (20,0 ± 1,0) °С – 60 ч, (27,0 ± 3,0) °С – 48 ч. В лаборатории 5—10 мл поверхностного слоя среды с материалом переносят в 50 мл 1 %-й пептонной воды без

теллурита калия (1 среда накопления) и делают высев на чашку щелочного агара с дальнейшим исследованием по изложенной схеме.

б) Пептонную воду повышенной щелочности в качестве накопительной среды рекомендуется использовать только на первом этапе исследования с удлинением срока инкубации ее до 18—24 ч. Основной раствор пептона и 1 %-ю пептонную воду с pH 9,5 ± 0,5 можно готовить впрок по общепринятой методике с подщелачиванием до необходимого уровня и последующей стерилизацией при температуре 120 °С – 20 мин.

Для подщелачивания пептонной воды используют 10—20 % NaOH.

Таблица 1

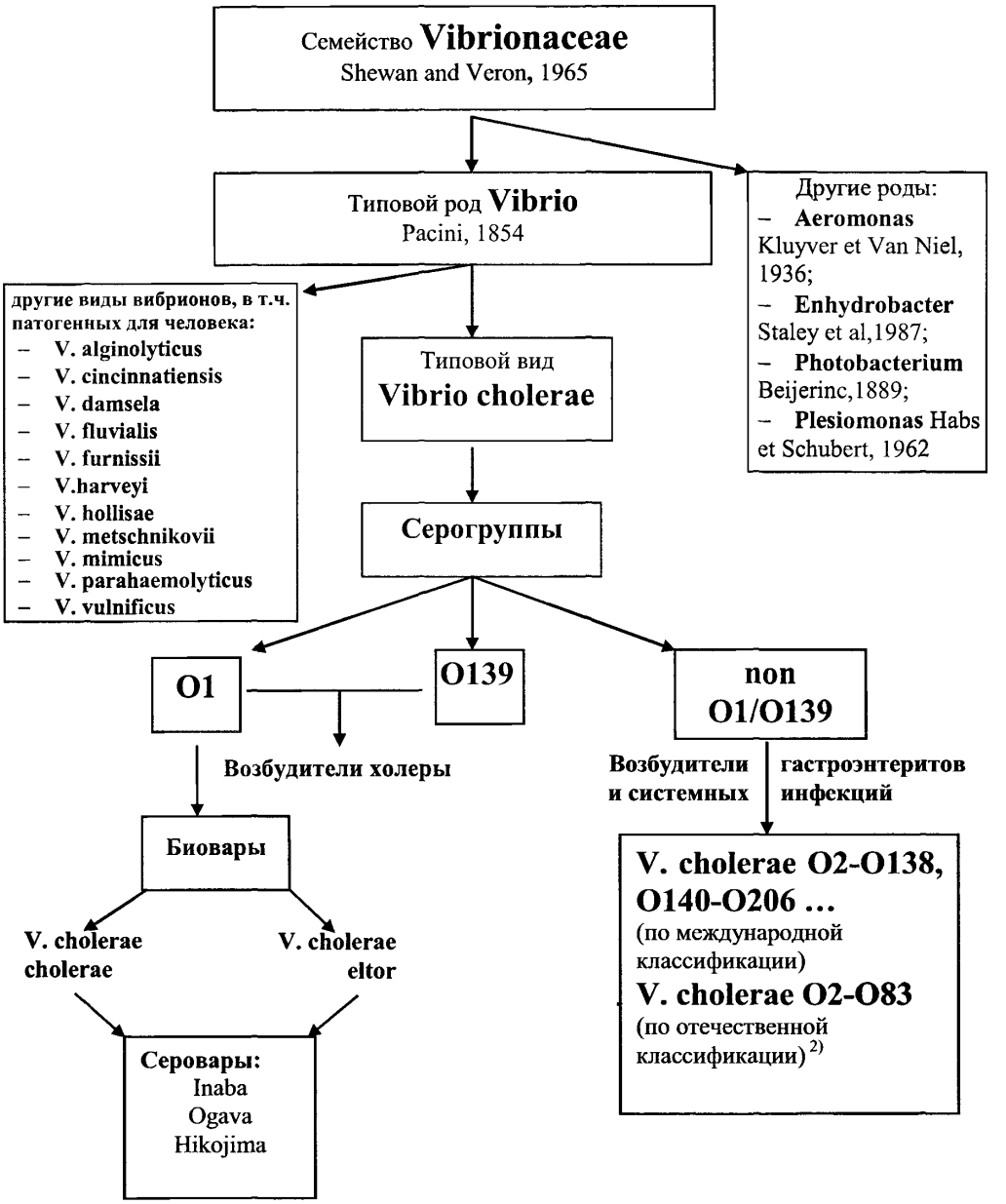
Порядок исследования материала в зависимости от времени отбора и доставки его в лабораторию в 1 % ПВ

№№ вариантов	Время взятия материала	Время доставки в лабораторию	Среда для взятия проб	Назначение среды	1-я среда накопления	2-я среда накопления. Высев с 1-й среды накопления	Высев со 2-й среды накопления
1	6^{00}—10^{00}	До 10^{00}	а) 1 % ПВ 50 мл б)1 % ПВ 5—10 мл	а) Среда накопления б) Транспортная среда	а) Среда с доставленным материалом б) посев в 50 мл 1 % ПВ	Через 6 ч инкубации пересев в 1 % ПВ с ТК и высев на щелочной агар и (или) ЭС	В начале следующего рабочего дня
2	10^{00} – до конца рабочего дня лаборатории	После 10^{00} в течение рабочего дня лаборатории	1 % ПВ 5—10 мл	Транспортная среда	Посев 5—10 мл среды с материалом в 50 мл 1 % ПВ с ТК	9^{00} следующего дня пересев в 1 % ПВ, высев на щелочной агар и (или) ЭС	Через 6 ч инкубации
3	По окончании рабочего дня лаборатории	До 10^{00} следующего дня	1 % ПВ 5—10 мл	Транспортная среда	Посев 5—10 мл среды с материалом в 50 мл 1 % ПВ	Через 6 ч инкубации пересев в 1 % ПВ с ТК, высев на щелочной агар и (или) ЭС	В начале следующего рабочего дня
4	Выходные дни лаборатории	До 10^{00} рабочего дня	1 % ПВ с ТК 50 мл	Транспортная среда	Посев 5—10 мл среды с материалом в 50 мл 1 % ПВ	Через 6 ч инкубации пересев в 1 % ПВ с ТК, высев на щелочной агар и (или) ЭС	В начале следующего рабочего дня

Обозначения: ТК – теллурит калия; ПВ – пептонная вода; ЭС – элективная среда для выделения холерного вибриона.

5.3. Идентификация культур холерных вибрионов

Культуры, выделенные на различных этапах, идентифицируют с целью определения их принадлежности к виду Vibrio cholerae соответствующей серогруппы (О1, О139 или других).



Примечания: 1) таксономия вибрионов представлена по Bergeys manual of Determinative Bacteriology,1994; 2) типовые штаммы O2-O39 соответствуют Sakazaki (1970); O40-O83, а также O12; O23 и O26 не изучены в сравнении с международной коллекцией типовых штаммов.

Рис. 2. Классификация вибрионов[1)]

К виду V. cholerae относят грамотрицательные, аспорогенные, полиморфные палочки, слегка изогнутые или прямые, активно подвижные, с одним полярно расположенным жгутиком, образующие индофенолоксидазу, ферментирующие глюкозу в

аэробных и анаэробных условиях до кислоты (без газа), расщепляющие маннит, маннозу, сахарозу, но не активные в отношении к арабинозе, инозиту, салицину и некоторым другим субстратам. Холерные вибрионы декарбоксилируют лизин и орнитин, но не обладают дигидролазой аргинина, образуют индол, обладают нитратредуктазой, не продуцируют сероводород. Таксономическое положение холерных вибрионов и признаки, дифференцирующие их от родственных микроорганизмов, приведены на рис. 2 и в табл. 2, 3, 4.

Таблица 2

Основные дифференциальные признаки рода Vibrio и некоторых других микроорганизмов

Признаки	Роды сем. Vibrionaceae						Enterobacteriaceae	Pseudomonadaceae
	Vibrio		Aeromonas	Enhydrobacter	Plesiomonas	Photobacterium		
	V. cholerae	другие виды						
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Окраска по Граму, морфология	Грамотрицательные *полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки*							
Подвижность	+	+ (–)	+ (–)	–	+	+	+ (–)	+
Оксидаза	+	+ (–)	+	+	+	+ (–)	–	+ (–)
Рост на средах без NaCl	+	– (+)	+	+	+	–	–	–
Чувствительность к 0-129 [1)]	+	+ (–)	–	–	+	+	–	–
О/Ф глюкозы в среде Хью-Лейфсона	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/–
Газ из глюкозы	–	– (+)	+ (–)	–	–	+	+/–	–
Лизиндекарбоксилаза	+	+ (–)	– (+)	+	+	+	+/–	– (+)
Орнитиндекарбоксилаза	+	+/–	– (+)	+	+	+	+/–	– (+)
Аргининдигидролаза	–	– (+)	+	+	+	+	–/+	+/–
Ферментация: лактозы	–	– (+)	– (+)	–	+	X	+/–	– (+)
маннита	+	+ (–)	+ (–)	X	–	–	+ (–)	+ (–)
арабинозы	–	– (+)	+ (–)	X	–	–	+ (–)	– (+)
сахарозы	+	+ (–)	+	X	–	– (+)	+/–	–
инозита	–	– (+)	–	X	+	–	– (+)	X
Образование: ацетилметилкарбинола	+ (–)	– (+)	+ (–)	–	–	+	– (+)	X
индола	+	+ (–)	+ (–)	–	–	–	+ (–)	+/–

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
нитратредуктазы	+	+ (–)	+	+	+	+ (–)	+	+/–
β-галактозидазы	+	+ (–)	+	X	+	+	– (+)	X
желатиназы	+	+ (–)	+	X	–	+	– (+)	+/–
Биолюминесценция	– (+)	– (+)	–	X	–	+	–	–
Мол. % G+C в ДНК	38	51	57—63	66	51	40—44	39—59	58—70

***Условные обозначения*:**

[1)] – бактериостатический агент 2,4-диамино-6,7-диизопропилптериоидин

X – нет данных;

\+ – положительный результат в 90 %;

– – отрицательный результат в 90 %;

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

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

Таблица 3

Дифференциация патогенных для человека видов рода Vibrio

Признаки	V. cholerae	V. alginolyticus	V. cincinnatiensis	V. damsela	V. fluvialis	V. furnissii	V. harveyi	V. hollisae	V. metschnikovii	V. mimicus	V. parahaemolyticus	V. vulnificus
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Морфология [1)]												
Подвижность	+	+	+	d	d	+	–	+/–	d	+	+	+
Роение на агаре	–	+	–	–	–	–	d	–	–	–	d	–
Индофенолоксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Образование:												
газа из глюкозы	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
индола	+	+	–	–	–	+ (–)	+	+	+ (–)	+	+	+
ацетилметилкарбинола	+ (–)	+	+/–	+	–	–	d	–	+	–	–	–
Ферментация:												
лактозы	–	–	–	–	–	–	–	–	+ (–)	– (+)	–	d
арабинозы	–	–	+	–	+	+	–	+	–	– (+)	+/–	–
сахарозы	+	+	+	–	+	+	d	–	+	–	–	–
целлобиозы	–	–	+	–	– (+)	– (+)	d	–	–	–	–	+

Продолжение табл. 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
маннита	+	+	–	–	+	+	d	–	+	+	+	+ (–)
салицина	–	–	+	–	+/–	–	–	–	–	–	–	+
Аргининдигидролаза	–	–	–	+	+	+	–	–	– (+)	–	–	–
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	+ (–)	–	–	+	–	+ (–)	+	+	+
Орнитиндекарбоксилаза	+	d	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+
β–галактозидаза	+	–	+/–	–	d	d	–	–	d	+	–	d
Нитратредуктаза	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Амилаза	+	+	+	x	+	d	+	x	+	–	+	+
Желатиназа	d	+	–	–	+/–	d	–	–	d	d	+	d
Рост в 1 %-й пептонной воде с NaCl:												
0 %	+	–	–	–	– (+)	– (+)	–	–	– (+)	+	–	–
3 %	+	+	+	+	+	+	+	+	– (+)	+	+	+
6 %	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	+	d
10 %	–	+	–	–	– (+)	–	–	–	–	–	–	–
Рост при:												
4 °C	–	–	–	–	–	–	–	x	–	–	–	–
20 °C	+	+	–	–	+	+	+	x	+	x	+	+
35 °C	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	+	+
42 °C	+	+	–	–	d	–	d	x	d	d	d	d
45 °C	–	–	–	–	d	–	–	x	d	x	–	–
Биолюминесценция	– (+)	–	–	–	–	–	d	–	–	–	–	–
Чувствительность к 0—129	+	– (+)	– (+)	+	d	–	+	d	+	+	– (+)	+

Условные обозначения: см. обозначения табл. 2;
[1] – грамотрицательные прямые или изогнутые палочки; d – различный результат.

Таблица 4

Отношение патогенных вибрионов к дифференцирующим углеводам

Виды вибрионов	Ферментация		
	арабинозы	маннозы	сахарозы
1	2	3	4
V. cholerae	–	+ (–)	+
V. mimicus	–	+	–
V. metschnikovii	–	+/–	+

Продолжение табл. 4

1	2	3	4
V. fluvialis	+	+	+
V. vulnificus	–	+ (–)	– (+)
V. alginolyticus	–	+	+
V. parahaemolyticus	+(–)	+	– (+)
V. hollisae	+	– (+)	–
V. furnissii	+	+ (–)	+
	с образованием газа		
V. damsela	–	+	–
	с образованием газа у некоторых штаммов		
V. cincinnatiensis	+	X	+
V. harveyi	–	X	+ (–)

Условные обозначения:
( ) – в скобках указан редко встречающийся вариант;
+ /– – приблизительно 50 % штаммов не обладают этими признаками;
X – нет данных.

Возбудителями холеры являются V. cholerae O1 (биоваров классического и эльтор; сероваров Инаба, Огава или Гикошима) и O139 серогрупп.

Токсигенные, эпидемически значимые варианты холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, содержащие гены холерного токсина (ctx AB) и токсин-корегулируемых пилей (tcp A), вызывают заболевания холерой, склонные к эпидемическому распространению.

Нетоксигенные (не содержащие гена холерного токсина), эпидемически неопасные варианты холерных вибрионов O1 могут вызывать спорадические или групповые заболевания холерой при общем источнике заражения.

Вид V. cholerae помимо возбудителей холеры включает холерные вибрионы других О серогрупп, в настоящее время их известно более 200. Отдельные штаммы некоторых из них могут вызывать единичные случаи диарей или заболевания с внекишечной локализацией возбудителя. Известны отдельные групповые заболевания или вспышки диарей, обусловленных ими, при общем источнике заражения.

Идентификацию выделенных на полиуглеводной среде или щелочном агаре агглютинирующихся на стекле культур проводят по сокращенной или полной схеме.

Сокращенная схема идентификации типичных по культуральным и морфологическим препаратам оксидазопозитивных культур, агглютинирующихся в слайд-агглютинации холерной O1 или O139 сывороткой предусматривает изучение культуры в развернутой реакции агглютинации с холерными сыворотками O1, Инаба, Огава и РО, определение чувствительности к диагностическим бактериофагам классическому и эльтор, отношения к глюкозе в среде Хью-Лейфсона, сахарозе, маннозе, маннитуи арабинозе в средах Гиса, а также лизину, орнитину и аргинину, и ориентировочную оценку эпидемической значимости по гемолитической активности в пробе Грейга и чувствительности к холерным эльтор ctx^+ и ctx^- фагам.

Культуры оксидазопозитивных, активно подвижных вибрионов, расщепляющие глюкозу в среде Хью—Лейфсона до кислоты без газа, декорбоксилирующие лизин и орнитин, не обладающие дигидролазой аргинин, ферментирующие сахарозу, маннозу, маннит в средах Гисса и инактивные по отношению к арабинозе, агглютинирующиеся

не менее чем до $^1/_2$ титра сыворотками О1 и одной из вариантоспецифических сывороток, относят к V. cholerae О1 серовара Огава или Инаба. Культуры, агглютинирующиеся обеими вариантоспецифическими сыворотками не менее чем до $^1/_2$ титра, относят к серовару Гикошима. В случае агглютинабельности выделенной культуры обеими вариантоспецифическими сыворотками целесообразно повторить исследование с использованием различных серий коммерческих препаратов.

Для подтверждения принадлежности выделенной культуры холерных вибрионов к О139 серогруппе достаточно положительного результата в слайд-агглютинации с соответствующей сывороткой в рабочем разведении.

Полная схема идентификации культур, агглютинирующихся холерными сыворотками О1 серогруппы, предусматривает изучение их по дополнительным тестам, определяющим принадлежность к биовару (гемагглютинация, чувствительность к поликсимину, реакция Фогес-Проскауэра), определение антибиотикограммы, окончательную оценку эпидзначимости по результатам исследования в ПЦР на наличие генов ctx и tcp, и определение токсигенности на модели кроликов-сосунков.

В случае выделения культур холерных вибрионов О139 серогруппы, их также изучают по чувствительности к антибиотикам, определяют эпидемическую значимость ориентировочно по гемолитической активности в пробе Грейга, окончательно – указанными выше специальными методами.

Токсигенные штаммы холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп, как правило, не лизируют эритроциты барана в пробе Грейга в отличие от нетоксигенных штаммов.

На культуры, имеющие характерные для вибрионов морфологические, культуральные и биохимические признаки, агглютинирующиеся О1 и одной из вариантоспецифических сывороток не менее чем до $^1/_2$ титра, лизирующиеся и не лизирующиеся холерным и эльтор фагами, а также на культуры, агглютинирующиеся сывороткой О139, выдают окончательный ответ, указывая чувствительность их к антибиотикам и оценку эпидемической значимости по результатам ориентировочных или специальных исследований.

Кроме того, для холерных вибрионов О1 серогруппы указывают биовар на основании чувствительности к одному из диагностических фагов (эльтор или классическому) и (или) по дополнительным признакам – для фагорезистентных культур (табл. 5).

Таблица 5

Признаки, дифференцирующие биовары V. cholerae O1

Признаки	Биовары	
	V. cholerae eltor	V. cholerae cholerae
Лизабельность холерными фагами:		
классическим	–	+
эльтор	+/–	– (+)
Чувствительность к 50 ед/мл полимиксина В	– (+)	+
Агглютинация куриных эритроцитов	+ (–)	–
Образование ацетилметилкарбинола	+ (–)	–

Культуры, имеющие признаки вибрионов по морфологии колоний и клеток, тесту на индофенолоксидазу и ферментативной активности на полиуглеводной среде, не агглютинирующиеся на стекле холерными сыворотками О1 и О139 серогрупп, выделенные от больных острыми кишечными инфекциями, идентифицируют по тестам, оп-

ределяющим принадлежность к роду Vibrio и виду V. cholerae (табл. 2 и 3). Принадлежащие к V. cholerae культуры изучают в пробе с диагностическими фагами. При выделении чувствительных к холерным диагностическим монофагам, но не агглютинирующихся холерными сыворотками О1 культур, особое значение имеет изучение их клеточного состава, т. к. в популяции таких штаммов могут находиться типичные холерные вибрионы О1 серогруппы. Если культура по совокупности признаков относится к виду холерных вибрионов, но не агглютинируется холерными О1 и О139 сыворотками, ее изучают в реакции агглютинации с набором диагностических холерных сывороток О2-О83 серогрупп по отечественной классификации (рис. 2).

На культуры, агглютинирующиеся одной из сывороток, выдают ответ о выделении V. cholerae О2, О5 или другой серогруппы.

Если культуры не типируются указанными холерными сыворотками или они отсутствуют в лаборатории, то выделенную культуру обозначают обобщенно – V. cholerae non О1/О139 серогрупп.

Кроме этого, штаммы V. cholerae non О1 типируют бактериофагами диагностическими холерными ТЭПВ 1—7.

Энтеропатогенные холерные вибрионы не О1 группы относятся преимущественно к О2, О5, О6, О8, 011, 013, 018, 037, 047, 050, 062, 065, 082, 083 серогруппам и, как правило, лизируются фагами ТЭПВ 1, 4, 7.

У выделенных от больных штаммов холерных вибрионов не О1/О139 серогрупп определяют антибиотикограмму. Для выделенных из окружающей среды вибрионов, не агглютинирущихся холерными О1 и О139 сыворотками, целесообразность полной таксономической характеристики определяется в каждом случае отдельно для конкретных территорий и объектов с учетом эпидситуации по холере и регистрации острых кишечных заболеваний, обусловленных этими микроорганизмами.

Идентификация атипичных культур холерных вибрионов

К атипичным относят культуры холерных вибрионов, отклоняющиеся от типичных по отдельным родовым и видовым признакам, а также по агглютинабельности группо- и вариантоспецифическими сыворотками О1 и чувствительности к диагностическим фагам (классическому и эльтор). Антигенная изменчивость холерных вибрионов О1 может выражаться в ослаблении до $^1/_4$ титра или утрате агглютинабельности холерными сыворотками О1, Инаба, Огава. Встречаются штаммы, агглютинирующиеся только холерной сывороткой О1 серогруппы и не реагирующие с вариантоспецифическими сыворотками (Инаба и Огава), что делает невозможным установление их серовара. В случае S-R диссоциации культуры холерных вибрионов начинают агглютинироваться РО-сывороткой. При этом в одних случаях штаммы агглютинируются всеми холерными сыворотками, в т. ч. и РО, их обозначают как SR-варианты, в других – измененные холерные вибрионы в диагностических титрах агглютинируются только с РО сывороткой и не агглютинируются холерными сыворотками О1, Инаба и Огава, их относят к R-вариантам.

В последние годы возросла частота встречаемости резистентных к диагностическим холерным фагам штаммов среди холерных вибрионов О1, выделяемых как от людей, так и из объектов окружающей среды.

При этом фагоустойчивость вибрионов, снижение или отсутствие агглютинабельности холерными сыворотками иногда сочетается с вариабельностью по другим признакам (культурально-морфологическим и биохимическим). Штаммы, атипичные по морфологическим признакам, образуют шероховатые, слизистые, мутные и пигментированные колонии. Размер их также может варьировать, вплоть до появления едва видимых карликовых колоний. У таких культур нередко снижена подвижность, наблю-

дается спонтанная агглютинация в 0,9 %-м растворе натрия хлорида. Отмечена возможность обнаружения в организме больного и в воде открытых водоемов холерных вибрионов в Л-форме. В мазках, сделанных из атипичных культур холерных вибрионов, клетки имеют форму шаров, сферопластов, встречаются вытянутые, извитые, неделящиеся клетки в виде цепей или нитей.

Нередко встречаются штаммы, измененные по биохимическим свойствам, у которых отмечается ослабление, замедление или утрата способности расщеплять углеводы и многоатомные спирты (крахмал, маннит, маннозу, сахарозу), аминокислоты (триптофан, лизин, орнитин) и другие субстраты.

Во всех случаях выделения атипичных культур обязательно изучение их по признакам, определяющим их принадлежность к роду Vibrio и виду Vibrio cholerae (определение типа расщепления глюкозы в среде Хью и Лейфсона, декарбоксилаз лизина и орнитина и дигидролазы аргинина, чувствительности в вибриостатику О129 — 2,4-диамино-6,7-диизопропилптеридину и др.).

Атипичные культуры холерных вибрионов, обладающие указанными выше признаками рода Vibrio и вида Vibrio cholerae, агглютинирующиеся сывороткой О1 до $^1/_4$ титра, лизирующиеся и не лизирующиеся диагностическими монофагами до ДРТ, следует относить к серогруппе О1.

Для всестороннего изучения все атипичные культуры холерных вибрионов следует направлять в специализированные лаборатории.

Для подтверждения принадлежности к V. cholerae О1 слабоагглютинирующихся (ниже $^1/_4$ титра), диссоциирующих и фагорезистентных культур обязательным является использование высокочувствительных методов (мультиплексным ПЦР набором праймеров) и, по возможности, реакции агглютинации с кроличьими холерными сыворотками, обладающими большей специфичностью, чем лошадиные, поскольку они не содержат пула неспецифических иммуноглобулинов.

Рекомендуется при изучении измененных по антигенной структуре культур использовать также такие методы, как РНГА, РНАт, иммунофлюоресценцию, преципитацию в геле, адсорбцию агглютининов по Кастеллани, реакцию агглютинации с убитыми кипячением культурами, пробу с комплементом, позволяющую отбирать из популяции измененных штаммов типичные, резистентные к нему клоны в S-форме.

При получении сомнительных результатов слайд-агглютинации с холерной сывороткой О139 серогруппы следует повторить исследование с гретой культурой.

Для серологической идентификации спонтанно агглютинирующихся культур применяют те же методы и дополнительно реакцию агглютинации с использованием осажденной культуры и 0,3 %-го раствора натрия хлорида для разведения диагностических сывороток и приготовления взвеси изучаемой культуры.

5.4. Учет анализов, оформление направлений и выдача результатов

Ответ о положительном результате может быть предварительным и окончательным.

Предварительный положительный ответ выдают по результатам ускоренного исследования нативного материала и после подращивания его в пептонной воде с помощью иммунофлюоресцентного метода, специфической иммобилизации, РНГА, а также по слайд-агглютинации сыворотками О1 и О139 подозрительных на холерный вибрион колоний. При наличии возможности на этом этапе может быть использована ПЦР со специфическими праймерами.

Предварительный ответ, в случаях проведения срочных анализов, сообщают устно и только при совпадении результатов не менее двух методов.

В условиях эпидемии холеры при проведении массовых исследований после идентификации первых культур такой ответ дает право на проведение противоэпидемических мероприятий.

Окончательный положительный ответ выдают по результатам сокращенной или полной идентификации выделенной культуры в течение 36—48 ч.

При проведении массовых исследований в очаге заболеваний холерой, когда первые культуры холерных вибрионов уже были идентифицированы по полной схеме, положительные результаты тестирования в слайд-агглютинации с холерными сыворотками О1 или О139 серогрупп в сочетании с морфологией и подвижностью клеток культур, выделенных от больных диареями или при обследовании на вибриононосительство, следует считать окончательными для решения вопросов о проведении противоэпидемических мероприятий. Достоверность таких результатов повышается при использовании ускоренных методов диагностики: иммунофлюоресцентного, иммобилизации соответствующими сыворотками, ПЦР и др.

Для полной идентификации выделенные культуры передают в назначенную для этих целей группу или лабораторию, специалисты которой при необходимости вносят в ответ соответствующие коррективы и дополнения, касающиеся определения антибиотикограммы, эпидемической значимости и токсигенности.

Отрицательный ответ может быть дан только по окончании исследования по полной схеме через 36—48 ч; при осуществлении эпиднадзора в условиях односменной работы лаборатории, допускающей использование теллурита калия, продолжительность анализа увеличивается до 3—4 суток.

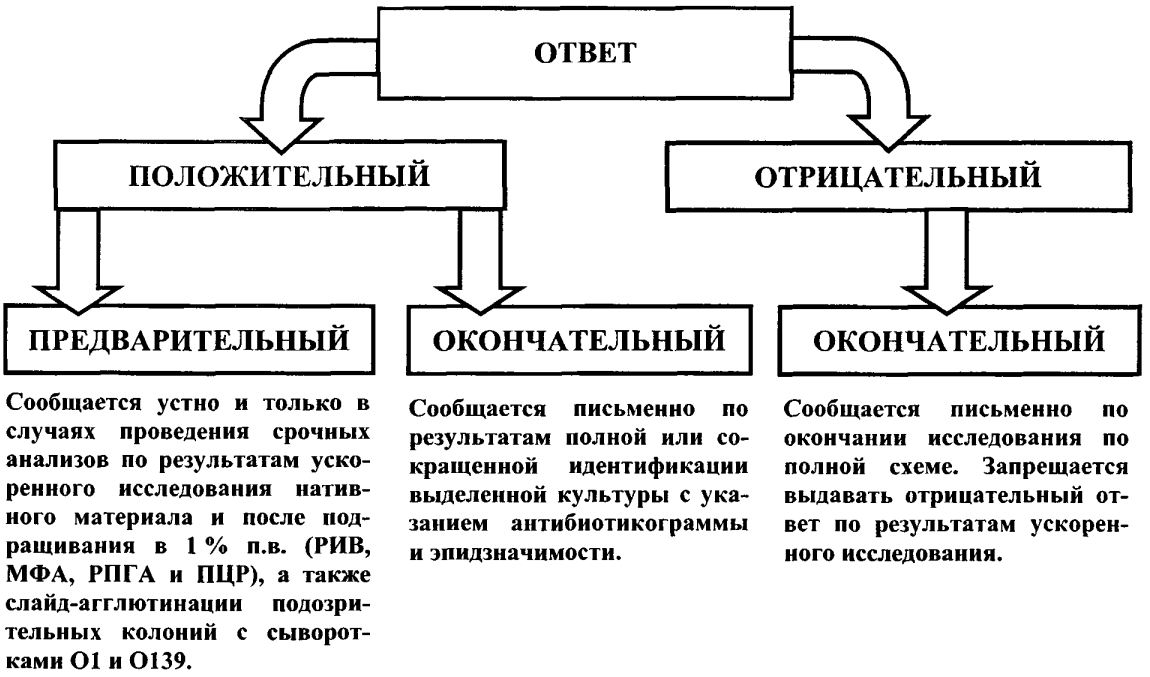


Рис. 3. Схема выдачи результатов исследований на холеру

Не допускается выдавать отрицательные ответы по результатам ускоренного исследования (МФА, РИВ, РНГА, и др.) до окончания анализа как в условиях эпидемии холеры, так и при проведении эпидемиологического надзора.

Схему выдачи ответов см. на рис. 3.

При осуществлении эпидемиологического надзора направление к анализу, а соответственно и ответ на него, оформляют индивидуально на каждого больного. При проведении большого объема исследований в очаге холеры направления к анализам и ответы на них оформляют списком. При обследовании здоровых людей на вибрионосительство и исследовании на холеру объектов окружающей среды групповые формы направления и ответов допускаются как при эпиднадзоре, так и в очаге холеры.

Учет анализов и культур ведут по установленным формам (прилож. 6, 7). Обязательным является ведение рабочих записей идентификации исследования подозрительных культур (прилож. 8), регистрация выделенных культур (прилож. 9), составление паспорта штамма (прилож. 10).

При работе в очаге холеры используют упрощенные формы регистрации анализов, учитывая, что более подробные сведения имеются в бланках направлений, находящихся в лаборатории до ликвидации очага. Для удобства работы направления за каждый день подшивают отдельно.

6. Методы изучения свойств холерных вибрионов

6.1.Серологические методы

Принадлежность холерных вибрионов к О1 или О139 серогруппе определяют в слайд-агглютинации или развернутой реакции агглютинации с холерными агглютинирующими сыворотками О1, Инаба, Огава, РО и с холерной сывороткой О139 серогруппы в соответствии с инструкциями по применению препаратов, а также в других реакциях с иммуноглобулиновыми препаратами, предназначенными для ускоренной диагностики холеры и идентификации возбудителя.

Слайд-агглютинацию ставят на обезжиренном стекле, помещенном в чашку Петри или на дне самой чашки, используя подозрительную на холерный вибрион колонию и (или) агаровую 12—18-часовую культуру и сыворотки О1 серогруппы в разведении 1 : 50—1 : 100. Сыворотку О139 разводят в соответствии с указанием на этикетке. Реакцию обязательно сопровождают контролями культуры в 0,9 %-м растворе хлорида натрия.

Развернутую реакцию агглютинации ставят и учитывают по общепринятой методике в соответствии с инструкцией по применению диагностических сывороток.

Для исключения спонтанной агглютинации рекомендуется ставить развернутую реакцию в 0,3 %-м растворе NaCl.

Диагностические сыворотки двукратно разводят 0,3 %-м раствором натрия хлорида в объеме 0,5 мл соответственно величине диагностического титра. Суспензию изучаемой культуры готовят в этом же растворе концентрацией 3×10^9—5×10^9 м.к./мл в объеме 8—10 мл. Взвесь выдерживают при комнатной температуре в течение 1,0—1,5 ч. В реакции используют поверхностный слой микробной взвеси, разведенной 0,3 %-м раствором натрия хлорида до концентрации 1 млрд м.к./мл, добавляя ее по 0,5 мл во все разведения сыворотки и контроль культуры (0,5 мл 0,3 %-го раствора натрия хлорида + 0,5 мл взвеси культуры). Учет и оценка результатов аналогичны основному варианту развернутой реакции.

Флюоресцентно-серологический метод (МФА – метод флюоресцирующих антител)

Метод дает возможность ускоренно идентифицировать выделенную культуру, а также выявить возбудителя холеры О1 и О139 серогруппы при содержании его в ис-

следуемом материале не менее чем 10^5 м.к./мл. Исследованию подлежат выделенная культура, нативный материал (испражнения и рвотные массы) и материал после подращивания.

Порядок приготовления мазков, обработка их флюоресцирующими иммуноглобулинами, микроскопия и оценка результатов, являющиеся общими для всех бактерий, описаны в «Наставлениях по применению иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих холерных адсорбированных лошадиных сухих».

Положительный результат может быть получен через 1,5—2,0 ч от начала исследования.

При просмотре мазков, обработанных иммуноглобулином холерным флюоресцирующим, особое внимание следует обращать на морфологию светящихся микробов, т. к. в отдельных случаях в мазках из испражнений здоровых людей может наблюдаться свечение микроорганизмов, отличающихся по морфологии от вибрионов (грубые крупные палочки, кокки).

Для устранения неспецифического свечения целесообразно использовать в качестве «гасителя» бычий альбумин, меченый родамином. Методика его использования описана в «Инструкции по применению альбумина бычьего, меченого родамином, сухого».

Реакция иммобилизации вибрионов под влиянием специфических холерных сывороток О1 и О139 серогрупп (РИВ)

Метод дает возможность обнаружить возбудителя в течение нескольких минут при концентрации его в исследуемом материале не менее 10^5 м.к/мл. На предметное стекло пипеткой или петлей наносят 2 капли испражнений, рвотных масс или поверхностного слоя среды обогащения. Первую каплю накрывают покровным стеклом (контроль), ко второй добавляют каплю О1 сыворотки в разведении 1 : 50, перемешивают и также накрывают покровным стеклом. Раздавленную каплю смотрят под микроскопом при увеличении ×400—600, используя фазово-контрастное устройство или конденсор темного поля.

При наличии в исследуемом образце холерных вибрионов в первой капле наблюдают характерную подвижность, во второй – иммобилизацию отдельных микробных клеток и образование неподвижных микроагглютинатов немедленно или в течение 1—2 мин. В случае неспецифического взаимодействия с диагностическими сыворотками наблюдается образование мелких подвижных конгломератов при активной подвижности отдельных клеток.

Реакция иммобилизации специфична и позволяет дать первый сигнальный ответ через 15—20 мин от начала исследования нативного материала. При отрицательном результате исследование повторяют после подращивания в 1 %-й пептонной воде.

В случае отрицательного результата необходимо провести аналогичное исследование с холерной сывороткой О139 серогруппы, которую разводят 1 : 5.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием диагностикума эритроцитарного холерного иммуноглобулинового

Порядок подготовки материала, ингредиентов, постановки реакции и ее учет изложены в «Инструкции по применению диагностикума эритроцитарного холерного антительного иммуноглобулинового», прилагаемой к препарату.

6.2. Биохимические свойства

Биохимическую активность холерного вибриона изучают, используя коммерческие среды и тест-наборы или среды лабораторного приготовления, рецептура которых изложена в разделе 7.

Определение индофенолоксидазы

а) С помощью реактивов.

Реактивы: 1 %-е водные растворы диметил-пара-фенилендиамина, тетраметил-пара-фенилендиамина (гидрохлорида), этилоксиэтил-пара-фенилендиамина серно-кислого (из набора для обработки бумаги «фотоцвет») и пара-аминодиметиланилина (гидрохлорида или оксалата) в сочетании с 1 %-м спиртовым раствором α-нафтола или без него.

Реактивы должны быть бесцветными, их следует хранить во флаконах из темно-коричневого стекла со стеклянной пробкой без доступа света в холодильнике. В случае помещения реактива во флаконы из светлого стекла их следует обернуть алюминиевой фольгой или темной бумагой.

Постановка пробы:

на поверхность 18-часовой агаровой культуры, подозрительной колонии или полусливного роста на щелочном агаре наносят 1 каплю 1 %-го водного раствора одного из указанных реактивов. Положительная реакция на индофенолоксидазу – ярко красная окраска культуры через 20—30 с.

При использовании двухкомпонентной реакции (в сочетании с α-нафтолом) в положительных случаях – синее окрашивание культуры в течение 1—2 мин.

б) Для постановки пробы на оксидазу можно использовать тест-систему ОКСИ-тест или специальные бумажки из набора СИБ, МТС-V или пропитать помещенную в чашку Петри полоску фильтровальной бумаги 2—3 каплями 1 %-го водного раствора одного из реактивов. Культуру наносят на полоску смоченной реактивом бумаги платиновой петлей (но не хромникелевой), стеклянной или деревянной палочкой и размазывают в виде небольшого пятнышка. Через 10—30 с появляется пурпурно-красное окрашивание, свидетельствующее о положительной реакции.

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

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

Учитывая возможную нестойкость реактивов и различную способность вибрионов к образованию оксидазы на различных питательных средах, пробу обязательно сопровождают положительными и отрицательными контролями соответственно с культурами вибрионов или псевдомонад и энтеробактерий, выращенными на используемом в лаборатории питательном агаре.

Определение типа расщепления глюкозы (тест Хью-Лейфсона)

В две пробирки со средой Хью-Лейфсона засевают уколом в столбик изучаемую культуру. Поверхность среды в одной из пробирок покрывают 0,5—1,0 мл стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют от 1 до 4 суток при температуре (37,0 ± 0,5) °С. Окисление определяют по желтой окраске среды только в аэробных, ферментацию – в аэробных и анаэробных условиях роста. Вибрионы расщепляют глюкозу по ферментативному типу.

Определение декарбоксилазной и дигидролазной активности

В пробирки со средами, содержащими лизин, орнитин, аргинин и контрольную среду без аминокислот, засевают по полной петле 18-часовой культуры и заливают 0,5—1,0 мл стерильного вазелинового масла. Инкубируют посевы при температуре

(37,0 ± 0,5) °С. Учет результатов ежедневно, при сомнительном результате – наблюдение до 4 суток. В результате ферментации глюкозы вначале происходит сдвиг pH в кислую сторону, а в дальнейшем при гидролизе аминокислот накапливаются амины, и происходит защелачивание среды.

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

Для посева используют культуру, выращенную в течение 12—20 ч на плотной питательной среде или в течение 3—4 ч – в жидкой питательной среде. Посевы на средах с углеводами и спиртами инкубируют при (37,0 ± 0,5) °С и учитывают через 6—18 ч.

Для определения диастатической активности кроме среды Гисса с крахмалом может быть использована и среда Кодама. Культуру засевают в среду и также инкубируют при (37,0 ± 0,5) °С. Через 18 ч в пробирку со средой Кодама добавляют 2—3 капли раствора Люголя. При разложении крахмала среда не окрашивается.

Определение протеолитических свойств

В столбик желатины уколом засевают 18-часовую культуру и инкубируют в течение 2—3 суток при температуре (22 ± 0,5) °С или при (37,0 ± 0,5) °С в течение 18 ч. Перед учетом результатов пробирки помещают в холодильник на 20 мин. При положительном результате желатина остается жидкой, а при отрицательном (и в контрольной пробирке) – затвердевает.

Определение образования индола

Холерные вибрионы при выращивании в средах, содержащих триптофан (пептонная вода, мясо-пептонный бульон, бульон Хоттингера и др.), расщепляют его с образованием индола, что выявляется с помощью индикаторных бумажек или реактива Эрлиха после инкубирования при температуре (37,0 ± 0,5) °С в течение 18 ч.

Определение образования сероводорода

Холерные вибрионы не продуцируют фермент тиосульфатредуктазу, т. е. не способны расщеплять неорганические серосодержащие соединения, присутствующие в среде Клиглера и маннозо-сахарозной среде – это является дифференциальным признаком. Однако они так же, как некоторые другие энтеробактерии, продуцируют фермент цистиндесульфогидролазу, за счет которого способны образовывать сероводород из серосодержащих аминокислот, присутствующих в достаточном количестве в бульоне Хоттингера, мясо-пептонном бульоне, но отсутствующих или содержащихся в незначительном количестве в 1 %-й пептонной воде. Поэтому для постановки этого теста культуры выращивают в 1%-й пептонной воде при температуре (37,0 ± 0,5) °С в течение 18—20 ч. Образование сероводорода регистрируют с помощью индикаторных бумажек.

Использование микротест-систем и СИБ

Для определения оксидазы, образования индола и сероводорода, декарбоксилаз лизина, орнитина, дигидролазы аргинина, ферментации углеводов и многоатомных спиртов при идентификации вибрионов можно также использовать Систему индикаторную бумажную (СИБ) и микротест-ситемы для биохимической идентификации вибрионов.

6.3. Выявление способности к биолюминесценции

Изучаемые штаммы засевают в 1 %-ю пептонную воду или на пластинки щелочного агара, инкубируют при температуре (37,0 ± 0,5) °С в течение 18 ч. Выросшие

культуры просматривают в темной комнате. Свечение наблюдают после 5—10-минутной адаптации в темноте.

6.4. Тесты дифференциации биоваров холерных вибрионов О1

Определение чувствительности к диагностическим холерным фагам

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

Для постановки реакции в чашки разливают щелочной агар. После застывания агара и подсушивания его в течение 30 мин при температуре 37 °С дно чашек делят на квадраты по количеству образцов фагов и 10-кратных разведений фага. В пробирку с 5 мл 0,5—0,7 %-го питательного агара, расплавленного и охлажденного до 45 °С, добавляют 0,1—0,2 мл 3—4-часовой бульонной культуры, тщательно смешивают и выливают на поверхность агара. Чашки оставляют при комнатной температуре с приоткрытыми крышками на 30 мин. В центр квадратов наносят штампом-репликатором, стандартной петлей или тонко оттянутой пастеровской пипеткой по капле фагов в соответствующих разведениях. После подсыхания капель чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре (37,0 ± 0,5) °С. Результаты учитывают через 3—4 и 18—20 ч. Наличие лизиса в виде одного «стерильного» пятна или группы мелких негативных колоний оценивается как положительный результат.

Определение чувствительности к полимиксину В

В расплавленный и остуженный до 45 °С питательный агар (pH 7,2 ± 0,1) добавляют полимиксин В из расчета 50 единиц на 1 мл среды. После тщательного перемешивания среду разливают в чашки Петри. На застывшие агаровые пластинки наносят обычной бактериологической петлей 18- или 3-часовую бульонную культуру. Результаты учитывают после инкубирования посевов при температуре 37 °С в течение 18 ч. Холерные вибрионы биовара cholerae не растут на полимиксиновом агаре, для холерных вибрионов биовара eltor – признак вариабелен.

Постановка реакции гемагглютинации

На предметное стекло в чашке Петри помещают каплю 0,9 %-го раствора хлорида натрия и суспендируют в ней петлей 18-часовую агаровую культуру. Затем добавляют каплю 2,5 %-й взвеси куриных эритроцитов, трижды отмытых 0,9 %-м раствором хлорида натрия. Стекло покачивают до смешивания взвеси эритроцитов и вибрионов. При положительной реакции в течение 1 мин наступает склеивание эритроцитов. Реакцию сопровождают двумя контролями: а) в каплю 0,9 %-го раствора хлорида натрия добавляют каплю 2,5 %-й взвеси эритроцитов; б) в капле 0,9 %-го раствора хлорида натрия суспендируют испытуемую культуру. Контроли должны быть отрицательными. Для постановки пробы могут быть использованы эритроциты морской свинки.

Постановка реакции Фогес-Проскауэра (на ацетилметилкарбинол)

Испытуемую культуру засевают в глюкозо-фосфатный бульон Кларка и инкубируют при температуре (37,0 ± 0,5) °С в течение 1—3 суток. Затем к 1 мл бульонной культуры добавляют 0,6 мл 6 %-го спиртового раствора альфа-нафтола и 0,4 мл 40 %-го

раствора едкого калия. Пробирки встряхивают и помещают в термостат на 1 ч. При положительной реакции среда окрашивается в розовый или ярко-красный цвет.

6.5. Тесты межвидовой дифференциации патогенных для человека вибрионов

Определение галофильности вибрионов

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма засевают в 1 %-ю пептонную воду с 3 % натрия хлорида. Через 3—4 ч инкубации при температуре (37,0 ± 0,5) °С переносят строго по 1 капле выросшей культуры в пептонную воду без NaCl, с 7 и 10 % натрия хлорида. Через 18—20 ч инкубации оценивают рост культур по помутнению среды.

К негалофильным относятся V. cholerae и V. mimicus, для роста которых достаточны следовые количества соли в среде. Вибрионы остальных видов, за исключением некоторых штаммов V. fluvialis и V. metshnikovii не растут в 1 %-й пептонной воде без добавления натрия хлорида и устойчивы к значительным его концентрациям.

Определение способности вибрионов к росту при разных температурах

Способность вибрионов к росту при температуре 4; 20; 30; 35; 40; 45 и 50 °С выявляют при посеве суточных культур в 1 %-ю пептонную воду с 0,5 % натрия хлорида для негалофильных вибрионов и с 1,5—2,0 % натрия хлорида для галофильных вибрионов. Наличие роста оценивают визуально в сравнении с контролем. Наблюдают за посевами ежедневно в течение 2 недель.

Определение нитратредуктазы

а) Суточную агаровую культуру засевают в 1 мл бульона Хоттингера с 0,1 % азотно-кислого калия. После 2-х суток инкубации при температуре (37,0 ± 0,5) °С в посевы добавляют 0,5 мл реактива Грисса. В положительных случаях среда сразу же окрашивается в красный цвет.

б) К 1—2-суточной культуре в бульоне Хоттингера с 0,1 % KNO_3 добавляют 3—5 капель реактива, представляющего собой смесь равных объемов 0,1 %-го раствора риванола в дистиллированной воде и 12 %-го раствора соляной кислоты. В случае положительной реакции бульон окрашивается в красный цвет.

Определение β-галактозидазы

Суточную агаровую культуру засевают на скошенную поверхность агара, содержащего 10 % лактозы. Посевы инкубируют 1—2 суток при температуре (37±0,5) °С. Петлю выросшей культуры суспендируют в 0,25 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, добавляют 0,25 мл водного раствора О-нитрофенил-b-D-галактопиранозита (ONPG) и помещают в термостат при (37 ± 0,5) °С. Реакцию учитывают через 20 мин, 1, 3 и 24 ч. В положительном случае взвесь приобретает желтую окраску, отрицательном – остается бесцветной.

6.6. Оценка эпидемической значимости холерных вибрионов

6.6.1. Определение гемолитической активности (по Грейгу)

К 1 мл 18—24-часовой культуры, выращенной в 4—5 мл мясо-пептонного бульона добавляют 1 мл 1 %-й взвеси трижды отмытых эритроцитов барана в физиологическом растворе. Смесь бульонной культуры и эритроцитов осторожно перемешивают встряхиванием и помещают на 2 ч в термостат при температуре (37,0 ± 0,5) °С, а затем в холодильник до следующего дня. Предварительный учет результатов проводят через 2 ч, окончательный – на следующий день. При положительной реакции наступает пол-

ный или частичный лизис эритроцитов (лаковая кровь). В контроле (1 мл бульона + 1 мл взвеси эритроцитов) гемолиз отсутствует. Чистоту опыта следует контролировать путем высева «смеси» на агаровую среду.

Для постановки пробы Грейга может быть использована дефибринированная кровь барана, консервированная борной кислотой или консервантом Алсевера. Консервированные эритроциты сохраняют свои свойства в течение 3-х месяцев. Перед постановкой пробы на гемолиз дефибринированную кровь центрифугируют при 2—3 тыс. об./мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляют, а осевшие эритроциты отмывают 0,9 %-м раствором хлорида натрия 2—3 раза с промежуточным центрифугированием до получения прозрачной надосадочной жидкости. Из отмытых эритроцитов приготавливают 1 %-ю взвесь в 0,9 %-м растворе хлорида натрия, которую можно хранить при температуре 4 °С 2—3 дня и использовать для постановки пробы Грейга описанным выше способом (рецепты консервантов см. раздел 7).

6.6.2. Определение эпидзначимости холерных вибрионов эльтор комплексным методом – по отношению к диагностическим холерным бактериофагам эльтор ctx^+ и ctx^- в соответствии с наставлением к препаратам и гемолитической активности

Методика определения гемолитической активности описана выше.

Для постановки пробы с фагом используют метод агаровых слоев. Испытуемую культуру в объеме 0,5 мл добавляют пипеткой в пробирку с 5,0 мл 0,5—0,7 %-го агара Мартена pH 7,6 ± 0,2, расплавленного и охлажденного до 45 °С. После перемешивания все содержимое выливают на подсушенную поверхность агара Мартена pH 7,6 ± 0,2 в чашку Петри. После застывания слоя агара с культурой на его поверхность наносят цельные фаги эльтор ctx^+ и ctx^-. После высыхания капель фагов чашки переворачивают агаром вверх и инкубируют при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

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

Таблица 6

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

Группы	Варианты	Гемолиз по Грейгу	Чувствительность к фагам		Оценка эпидемической значимости
			ctx^+	ctx^-	
I	1	–	+	–	Эпидемически опасны
II	2	–	–	–	Для оценки эпидемической значимости необходимы дополнительные исследования на наличие генов ctx AB, tcpA или определение токсигенности на кроликах-сосунках
	3	–	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	–	
III	6	+	–	+	Эпидемически не опасны
	7	+	–	–	
	8	–	–	+	

6.6.3. Определение токсигенности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков

Исследования проводят в лабораториях, имеющих разрешение на экспериментальную работу с микроорганизмами I—II групп патогенности.

Для заражения животных используют 4-часовую агаровую культуру, выращенную при температуре (37,0 ± 0,5) °С или 18-часовую – при температуре (20,0 ± 1,0) °С. Необходимо использовать две заражающие дозы: 1×10^5 и 1×10^7 м.к., которые вводят внутрикишечно в объеме по 0,2 мл двум кроликам. Заражающую дозу контролируют путем высева на две чашки щелочного агара 0,1 мл взвеси из разведения 1×10^3 м.к./мл. Кроликов 10—12-дневных, массой 130—160 г, фиксируют к станку брюшком вверх, выстригают шерсть на операционном поле и смазывают его йодом. Дают эфирный или внутримышечно тиопенталовый наркоз (0,2 мл 1 %-го раствора на 100 г массы). Делают разрез длиною 1 см по средней линии живота на уровне пупка. Извлекают петлю тонкого кишечника на длинной брыжейке, фиксируют с помощью мягкого пинцета и вводят взвесь вибрионов. Петлю погружают в брюшную полость, брюшную стенку и кожу послойно зашивают. Шов смазывают йодом. Оперированных крольчат кормят с помощью шприца молоком и наблюдают 48 ч. Всех погибших и умерщвленных через 48 ч животных вскрывают и делают высев содержимого кишечника на чашки щелочного агара. Наиболее выраженные изменения наблюдаются в толстом кишечнике, который растянут бесцветной или светло-желтой прозрачной или слегка опалесцирующей жидкостью. Слепая кишка и прилегающие отделы толстого кишечника могут быть настолько растянуты, что сквозь них видны подлежащие петли кишечника, что создает видимость полной прозрачности кишечного содержимого. Тонкий кишечник расширен и также заполнен полупрозрачным содержимым. Описанные изменения характерны для «синдрома холерогенности», наблюдаемого при заражении эпидемически опасными, содержащими ген холерного токсина штаммами.

Токсигенные (содержащие ген холерного токсина) штаммы холерных вибрионов вызывают гибель большинства зараженных животных дозами 1×10^5 и 1×10^7 м.к. в течение первых двух суток с описанным выше типичным «синдромом холерогенности».

Штаммы холерных вибрионов, не содержащие гена холерного токсина, как правило, не вызывают гибели животных и изменений в кишечнике или обусловливают накопление в кишечнике выживших или единичных павших животных мутной, бесцветной или коричневато-жёлтой жидкости, т. е. развитие энтеропатогенного синдрома, связанного с реализацией других факторов патогенности.

Обязательной проверке на модели кроликов-сосунков при отсутствии возможности определения эпидзначимости другими методами подлежат следующие штаммы V. cholerae O1 и O139 серогрупп.

а) Выделенные от людей:

- гемолизнегативные штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы;
- гемолизпозитивные штаммы холерных вибрионов обеих серогрупп;
- гемолизнегативные штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы, атипичные по серологическим свойствам и устойчивые к фагам эльтор и ctx^+.

б) Выделенные из объектов окружающей среды:

- гемолизотрицательные штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенные при отсутствии эпидосложнений по холере.

6.6.4. Определение генов холерного токсина (ctx AB) и токсинкорегулируемых пилей (tcp A)

А. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Методом ПЦР проводят определение генов холерного токсина (ctx AB) и токсинкорегулируемых пилей (tcp A).

В основе ПЦР лежит амплификация (умножение) участка генома, ограниченного парой специфических праймеров, путем многократного копирования при помощи фермента – термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы). Образование в результате реакции фрагментов ДНК ожидаемого размера свидетельствует о наличии в пробе специфической ДНК.

Материал для исследования. Материалом для исследования может быть клинический материал (испражнения, рвотные массы), объекты окружающей среды (вода поверхностных водоемов, смывы с поверхностей, стоки, ил), чистые культуры вибрионов, I и II среда накопления. Первичную подготовку, обеззараживание материала и выделение ДНК проводят в соответствии с МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности».

Подготовка проб для ПЦР. Подлежащие исследованию пробы испражнений или рвотных масс в объеме 1 мл (1 г) помещают в стерильные флаконы и добавляют 0,9 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, суспендируют встряхиванием и отстаивают в течение 10 мин. Затем для отделения крупных частиц центрифугируют в течение 3 мин при 5 000 g (об/мин). Надосадочную жидкость центрифугируют в течение 15 мин при 12 000 g (об/мин), после чего осадок ресуспендируют в 100 мкл дистиллированной воды. Подготовленную таким образом пробу обеззараживают.

Воду из поверхностных водоемов (стоки) центрифугируют в полном объёме (1 л) в центрифужных стаканах ёмкостью 250 мл в течение 15 мин при 12 000 g (об/мин.). Осадок ресуспендируют в 1 000 мкл или 1,5—2,0 мл дистиллированной воды. Пробы обеззараживают.

Подозрительные колонии и чистые культуры, выросшие на плотных питательных средах, суспендируют в 50 мкл дистиллированной воды в микропробирке объемом 1,5 мл, доводя концентрацию до 5 единиц по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-59-86П), что соответствует 1×10^9 м.к./мл для вибрионов. Затем готовят 10-кратные разведения взвесей в дистиллированной воде до необходимой концентрации с учетом чувствительности используемой ПЦР-тест-системы и обеззараживают.

При исследовании сред накопления их центрифугируют в течение 15 мин при 12 000 g (об/мин). Осадок ресуспендируют в 100 мкл дистиллированной воды и обеззараживают.

Обеззараживание проб. Все пробы обеззараживают путем кипячения в течение 30 мин, что обеспечивает инактивацию культур холерных вибрионов согласно пункту 2.8.16 СП 1.3.1285—03.

Выделение ДНК. Из подготовленных и обеззараженных таким образом проб проводят выделение ДНК с помощью сертифицированных наборов для выделения ДНК и согласно прилагаемой к набору инструкции. При исследовании чистых культур этап выделения ДНК опускают, для постановки ПЦР используют обеззараженные кипячением бактериальные взвеси.

Постановка ПЦР. Для постановки ПЦР используют разрешенные комитетом МИБП к применению в практике здравоохранения ПЦР-тест-системы. Работу выполняют согласно прилагаемой к тест-системе инструкции. Амплификацию проводят на программируемых термоциклерах отечественного и зарубежного производства.

Учет результатов ПЦР. Для учета результатов ПЦР используют электрофорез в агарозном или полиакриламидном геле. Условия проведения электрофореза, визуализации результатов и их учет отражены в инструкциях к ПЦР-тест-системам.

При этом следует обратить внимание на следующие моменты:

- если в положительном контроле отсутствует специфическая полоса (ошибка в постановке реакции, неправильное хранение или загрязнение реактивов в процессе работы, сбой программы амплификатора) – требуется повторная постановка реакции;
- если в отрицательном контроле выявляется специфическая полоса на уровне положительного контроля (контаминация реактивов положительной ДНК или продуктами амплификации) – необходимо поставить дополнительные отрицательные контроли на этапе постановки ПЦР. Если результат повторяется – необходимо сменить реактивы.

Наличие полос ампликонов, располагающихся выше или ниже контрольной полосы, является неспецифическим ответом, и результат реакции оценивается как отрицательный.

6.7. Оценка антибиотикочувствительности

Для оценки антибиотикочувствительности холерного вибриона используют диско-диффузионный метод и методы серийных разведений в агаре и бульоне.

Методы и критерии оценки антибиотикочувствительности холерного вибриона разработаны и стандартизованы для указанных методов и ограниченного перечня антибиотиков: ампициллина, тетрациклина, доксициклина, ко-тримоксазола, хлорамфеникола.

Для оценки чувствительности холерного вибриона к другим антибиотикам, прежде всего к фторхинолонам, временно предлагается использовать методы и критерии оценки, разработанные для микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae. В пользу возможности такого допущения говорит тот факт, что методы и критерии, разработанные для перечисленных выше антибиотиков, полностью совпадают с таковыми для семейства Enterobacteriaceae.

В международной практике основной средой, используемой во всех методах оценки антибиотикочувствительности, является среда Mueller-Hinton (агар и бульон). Рассматриваемые в последующих разделах критерии величины МПК, позволяющие отнести исследуемые микроорганизмы к одной из категорий: «чувствительные», «устойчивые» или «промежуточные», разработаны именно для среды Mueller-Hinton.

Следует признать возможность использования для оценки антибиотикочувствительности и других сред (например, АГВ) в том случае, если они удовлетворяют требованиям, изложенным в разделе 6.7.3. Контроль качества питательных сред для определения антибиотикочувствительности с учётом соответствующих требований проводят в лабораториях учреждений, имеющих необходимые для этого референтные штаммы микроорганизмов. Указанные учреждения ежегодно информируют курируемые лаборатории о возможности использования для этих целей конкретных питательных сред с указанием номера серий и даты выпуска или снабжают их готовыми партиями сред.

6.7.1. Методы серийных разведений

Постановка методов серийных разведений для оценки антибиотикочувствительности включает следующие этапы:

- приготовление растворов антибиотиков;

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

Общим и крайне важным этапом для всех методов серийных разведений является приготовление растворов антибиотиков.

Приготовление растворов антибиотиков

Различают основные растворы антибиотиков – пригодные для хранения и рабочие – используемые «ex tempore» для приготовления питательных сред.

Для приготовления основных растворов антибиотиков предпочтительно использовать субстанции препаратов с известной активностью, допускается использование готовых инъекционных лекарственных форм препаратов, оральные лекарственные формы не пригодны. Для приготовления навесок антибиотиков необходимо использовать аналитические весы или другие равного класса точности.

Основные растворы антибиотиков готовят в концентрации 1 000,0 мкг/мл и выше. Навески антибиотиков для приготовления основных растворов готовят с учетом их активности.

В связи с тем, что антибактериальные препараты существенно различаются по растворимости, в ряде случаев возникает необходимость использовать разные вещества для первичной солюбилизации препаратов (растворители) и для доведения их до заданной концентрации (разбавители). В тех случаях, когда растворители и разбавители являются разными веществами, для солюбилизации антибиотика необходимо использовать минимально возможное количество растворителя.

Отличные от воды растворители и разбавители для отдельных антибиотиков приведены в табл. 7. Основные растворы необходимо хранить при температуре не выше –20 °С (сроки хранения отдельных антибиотиков при этой температуре существенно различаются). Оптимальными условиями для хранения основных растворов антибиотиков является температура –60 °С и ниже, длительность не более 6 месяцев.

Таблица 7

Растворители и разбавители, используемые для приготовления основных растворов антибиотиков

Антибиотик	Растворитель	Разбавитель
1	2	3
Ампициллин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л pH 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л pH 6,0
Хлорамфеникол	95 %-й этанол	Вода
Норфлоксацин Офлоксацин	$^1/_2$ объема воды, затем добавлять по каплям 0,1 моль/л раствор NaOH до растворения	Вода
Налидиксовая кислота	$^1/_2$ объема воды, затем добавлять по каплям 1 моль/л раствор NaOH до растворения	Вода

Продолжение табл. 7

1	2	3
Нитрофурантоин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л pH 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л pH 8,0
Рифампин	Метанол	Вода
Сульфаниламиды	$^1/_2$ объема горячей воды и минимальное количество 2,5 моль/л раствора NaOH	Вода
Триметоприм	0,05N раствор соляной кислоты до 10 % от конечного объема	Вода

С целью предотвращения конденсации влаги извлеченные из морозильника флаконы с основными растворами антибиотиков, прежде чем открыть, необходимо выдержать до достижения ими комнатной температуры.

Размороженные основные растворы должны быть использованы для приготовления рабочих растворов, их повторное замораживание не допускается.

Из основных растворов антибиотиков готовят рабочие двукратные концентрации. За основу берется конечная концентрация антибиотика в питательной среде, равная 1,0 мкг/мл (более высокие – 2, 4, 8 и т. д.; более низкие – 0,5; 0,25; 0,125 и т. д.). Реальные концентрации рабочих растворов должны учитывать фактор разбавления раствора антибиотика в питательной среде (обычно 1 : 10 в плотной среде и 1 : 2 в жидкой). Для приготовления рабочих растворов используется дистиллированная вода (метод серийных разведений в агаре) или жидкая питательная среда (метод серийных разведений в бульоне).

Примерный диапазон концентраций антибиотиков, используемых при оценке чувствительности к отдельным препаратам, приведен в табл. 8. В зависимости от целей исследования возможно использовать и иные диапазоны концентраций.

Таблица 8

Диапазон концентраций антибиотиков для оценки чувствительности микроорганизмов

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

6.7.1.1. Методы серийных разведений в агаре

Приготовление питательных сред с антибиотиками

Сухая агаризованная питательная среда растворяется и автоклавируется в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования колбы с питательной средой помещаются на водяную баню при 48—50 °С, где выдерживаются до достижения указанной температуры, после чего в них асептически вносят рабочие растворы антибиотиков (1 часть рабочего раствора антибиотика на 9 частей расплавленного агара). Затем среду тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри, толщина слоя питательной среды должна быть 3—4 мм.

Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Приготовленные указанным образом чашки Петри предпочтительнее использовать немедленно. Допускается хранение в запаянных полиэтиленовых пакетах при 4—8 °С в течение 5 суток. При этом необходимо иметь в виду, что некоторые беталактамные антибиотики, особенно при низких концентрациях, не выдерживают даже указанный срок хранения.

Параллельно с чашками Петри, содержащими растворы антибиотиков, для контроля роста готовят чашки Петри без антибиотиков.

Приготовление суспензии исследуемого микроорганизма, ее стандартизация и инокуляция. Инкубация

Для приготовления суспензии используют 3—4-часовую бульонную или суточную агаровую культуру холерного вибриона.

Для получения бульонной культуры отбирают одну или несколько четко изолированных колоний, легким прикосновением петли к центру колонии переносят незначительное количество материала в пробирку с 4,0—5,0 мл жидкой неселективной среды, например МПБ. Инкубируют при 37 °С. Приблизительно через 3—4 ч инкубации мутность бульонной культуры соответствует $1—2 \times 10^8$ м.к./мл.

Для получения суточных агаровых культур можно использовать только четко изолированные колонии, выросшие на неселективных питательных средах. Взвесь агаровых культур в концентрации 10^9 м.к./мл готовят на стерильном изотоническом растворе или бульонной среде по ОСО ГИСК им. Л. А. Тарасевича – ОСО-42-25-59-86П.

Конечная посевная доза на поверхности питательной среды должна составлять 10^4 м.к. Поскольку коммерческие инокуляторы, штампы-репликаторы или стандартная бактериологическая петля диаметром 3,0 мм переносят 1—2 мкл жидкости, концентрация вибрионов в суспензии для инокуляции должна быть 10^7 м.к./мл.

Для получения суспензии требуемой концентрации (10^7 м.к./мл) бульонную культуру следует развести в 10 раз, а взвесь агаровой – в 100 раз. Суспензию необходимо инокулировать на поверхность агара в течение 15 мин после приготовления, при этом образуется пятно диаметром 5—8 мм.

После инокуляции чашки оставляют при комнатной температуре для подсыхания, далее переворачивают и инкубируют при 37 °С в течение 16—20 ч.

Для контроля качества приготовления суспензий периодически рекомендуется проводить подсчет реальных колониеобразующих единиц путем высева на плотную питательную среду.

Важнейшим требованием контроля качества постановки метода является высев использованной для инокуляции суспензии на плотную неселективную среду для контроля чистоты культуры.

Результат оценки антибиотикочувствительности имеет смысл учитывать только при подтверждении чистоты культуры.

Учет результатов проводят, поместив чашку на темную, не отражающую поверхность. За МПК принимают концентрацию, вызвавшую полную ингибицию видимого роста. Для дифференцировки нежного роста от налета, оставшегося после инокулята, в ряде случаев целесообразно использовать увеличение. Появление единственной колонии на чашке с концентрацией на 1 разведение выше, чем явная МПК, можно не учитывать.

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

Интерпретацию результатов проводят с учётом данных, приведенных в табл. 9, с отнесением штаммов к «чувствительным», «устойчивым» или «промежуточным».

6.7.1.2. Метод серийных разведений в бульоне

Наиболее распространен следующий способ постановки метода серийных разведений в бульоне.

Жидкая питательная среда, прошедшая предварительный контроль качества, готовится в соответствии с инструкцией изготовителя.

Рабочие растворы антибиотиков готовят в асептических условиях по схеме, аналогичной для метода серийных разведений в агаре, но в жидкой питательной среде и в концентрациях, вдвое превышающих заданные, затем разливают по 1,0 мл в пробирки.

Суспензию исследуемого микроорганизма готовят из бульонной или взвеси агаровой культуры путем разведения в жидкой питательной среде до концентрации 10^6 м.к./мл и вносят по 1,0 мл в пробирки с растворами антибиотиков. Таким образом, конечная концентрация микроорганизмов в инкубационной среде будет равна 5×10^5 м.к./мл.

Посевы инкубируют при 37 °С в течение 16—20 ч.

Учет результатов проводят визуально или спектрофотометрически. За МПК принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста.

При постановке метода необходимо предусмотреть следующие контроли:

- чистоту суспензии микроорганизма, использованной для инокуляции, путем высева на неселективные среды;
- рост культуры в среде без антибиотика.

Качество постановки метода контролируется периодически с использованием референтных штаммов.

6.7.2. Диско-диффузионный метод

Постановка диско-диффузионного метода включает следующие этапы:

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

Для получения достоверных результатов при постановке диско-диффузионного метода необходимо жестко соблюдать правила хранения и использования коммерческих дисков, в противном случае содержание в них антибиотиков может упасть ниже допустимого уровня (прежде всего в результате увлажнения) еще до истечения срока годности. Диски должны храниться при температуре 4—8 °С, плотно укупоренными, для дополнительной гарантии защиты от увлажнения во флаконах коммерческих дис-

ков содержится силикагель. Флаконы с дисками следует извлекать из холодильника за 1 ч до начала работы и выдерживать закрытыми при комнатной температуре, что обеспечит выравнивание температуры дисков и окружающей среды и, соответственно, предотвратит образование конденсата влаги после открывания флаконов.

Приготовление чашек с питательной средой

К качеству питательных сред для постановки диско-диффузионного метода выдвигаются те же требования, что и к плотным питательным средам для постановки метода серийных разведений в агаре, соответственно используются и те же методы контроля качества.

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

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

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

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

Приготовление суспензии и инокуляция

Для приготовления инокулята используют 18—20-часовую агаровую или 3—4-часовую бульонную культуру холерного вибриона. Суспензию или бульонную культуру доводят до концентрации 10^9 м.к./мл по отраслевому стандартному образцу ГИСК им. Л. А. Тарасевича – ОСО-42-25-59-86П и разводят в 10 раз изотоническим раствором хлорида натрия до конечной концентрации 10^8 м.к./мл.

Приготовленный таким образом инокулят наносят в количестве 1—2 мл на поверхность питательной среды, равномерно распределяют по поверхности покачиванием и удаляют избыток жидкости пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10—15 мин.

Наложение дисков и инкубация

Не позднее, чем через 15 мин после инокуляции, на поверхность питательной среды наносят диски с антибиотиками.

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

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

Учет и интерпретация результатов

После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал на них под углом в 45° (учет в

отраженном свете). Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряют с точностью до 1 мм, при этом предпочтительнее пользоваться штангенциркулем или кронциркулем. При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на полную ингибицию видимого роста. Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и на едва заметный налет у края зоны. Крупные колонии, выявляемые в пределах четкой зоны ингибиции роста, свидетельствуют о наличии посторонней микрофлоры или о гетерорезистентности популяции, в этом случае необходима повторная идентификация и повторение исследования на антибиотикочувствительность.

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

Интерпретация результатов производится по табл. 9.

Таблица 9

Пограничные значения диаметров зон ингибиции роста (мм) и величин МПК (мкг/мл) антибиотиков в отношении Enterobacteriaceae spp.

Антибактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Диаметры зон ингибиции (мм)			МПК (мкг/мл)		
		устойчивые	промежуточные	чувствительные	устойчивые	промежуточные	чувствительные
БЕТАЛАКТАМЫ							
Ампициллин*	10	<=13	14—16	>=17	>=32	16	<=8
Цефотаксим	30	<=14	15—22	>=23	>=64	16—32	<=8
Цефтриаксон	30	<=13	14—20	>=21	>=64	16—32	<=8
Цефтибутен	30	<=17	18—20	>=21	>=32	16	<=8
АМИНОГЛИКОЗИДЫ							
Канамицин	30	<=13	14—17	>=18	>=64	32	<=16
Гентамицин	10	<=12	13—14	>=15	>=16	8	<=4
Тобрамицин	10	<=12	13—14	>=15	>=16	8	<=4
Амикацин	30	<=14	15—16	>=17	>=64	32	<=16
Сизомицин	10	<=12	13—14	>=15	>=16	8	<=4
ХИНОЛОНЫ							
Налидиксовая к-та	30	<=13	14—18	>=19	>=32	–	<=16
Норфлоксацин	10	<=12	13—16	>=17	>=16	8	<=4
Пефлоксацин	5	<=12	13—16	>=16	>=8	4	<=2
Офлоксацин	5	<=12	13—15	>=16	>=8	4	<=2
Ципрофлоксацин	5	<=15	16—20	>=21	>=4	2	<=1
Ломефлоксацин	10	<=18	19—21	>=22	>=8	4	<=2
ТЕТРАЦИКЛИНЫ							
Тетрациклин*	30	<=14	15—18	>=19	>=16	8	<=4
Доксициклин*	30	<=12	13—15	>=16	>=16	8	<=4
ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ							
Хлорамфеникол*	30	<=12	13—17	>=18	>=32	8	<=4
Ко-тримоксазол *	1,25/ 23,75	<=10	11—15	>=16	>=4/76	–	<=2/38
Нитрофурантоин	300	<=14	15—16	>=17	>=128	64	<=32
* – методы и критерии оценки стандартизованы для холерного вибриона							

6.7.3. Контроль качества питательных сред для определения антибиотикочувствительности

Качество питательной среды является одним из критических параметров для корректной оценки антибиотикочувствительности. Важнейшими показателями качества питательной среды являются концентрации двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+}, влияющих на активность аминогликозидных антибиотиков и тетрациклинов, а также тимина и тимидина, являющихся антагонистами сульфаниламидных препаратов и триметоприма.

Перед использованием в экспериментах по оценке антибиотикорезистентности каждая новая партия среды (Mueller-Hinton или какой-либо другой) должна пройти контроль качества в соответствии с описанным ниже методом.

А. Определение pH среды

Определение pH среды проводят после автоклавирования и охлаждения до комнатной температуры 25 °С, приемлемый диапазон 7,2—7,4. При величине pH среды, выходящей за указанные пределы, возможны существенные изменения в величине МПК.

Б. Контроль катионного состава

Для получения воспроизводимых результатов оценки антибиотикорезистентности питательная среда должна содержать Ca^{2+} 20—25 мг/л и Mg^{2+} 10,0—12,5 мг/л.

Наиболее доступным интегральным методом оценки качества сред (как жидких, так и агаризованных) является сопоставление экспериментально полученной величины МПК референтных штаммов микроорганизмов с этим показателем, приведенным в их паспортной характеристике.

Наиболее подходящим штаммом для оценки качества жидких и плотных питательных сред, предназначенных для изучения антибиотикорезистентности, является штамм Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. Среду следует считать удовлетворительной по качеству, если величина МПК гентамицина находится в пределах 0,5—2,0 мкг/мл. Выбор гентамицина для контроля качества связан с тем, что аминогликозидные антибиотики наиболее чувствительны к колебаниям концентрации двухвалентных катионов.

В. Для контроля на наличие антагонистов сульфаниламидных препаратов и триметоприма рекомендуется использовать штамм Enterococcus faecalis ATCC 29212. При величине МПК триметоприма/сульфаметоксазола < 0,5/9,5 мкг/мл среду следует признать удовлетворительной по качеству.

Определение величины МПК антибиотиков (или диаметров зон ингибиции роста) в отношении референтных штаммов в целях контроля качества среды проводят в соответствии с описанными выше методами. Категорическим требованием является использование антибиотиков с предварительно известной активностью.

Таблица 10

Значения величин МПК (мкг/мл) для референтных штаммов

Антибиотики	E. faecalis ATCC 29212	E. coli ATCC 25922	P. aeruginosa ATCC 27853
1	2	3	4
Ампициллин	0,5–2,0	2—8	–
Цефтибутен	–	0,12—0,50	–
Цефотаксим	–	0,03—0,12	8—32
Цефтриаксон	–	0,03—0,12	8—32

Продолжение табл. 10

1	2	3	4
Налидиксовая кислота	–	1—4	–
Норфлоксацин	2—8	0,03—0,12	1—4
Ципрофлоксацин	0,25—2,00	0,004—0,015	0,25—1,00
Офлоксацин	1—4	0,015—0,120	1—8
Ломефлоксацин	2—8	0,03—0,12	1—4
Амикацин	64—256	0,5—4,0	1—4
Гентамицин	4—16	0,25—1,00	0,5—2,0
Нетилмицин	4—16	<0,5—1,0	0,5—8,0
Тобрамицин	8—32	0,25—1,00	0,25—1,00
Канамицин	16—64	1—4	–
Хлорамфеникол	4—16	2—8	–
Тетрациклин	8—32	0,5—2,0	8—32
Рифампин	0,5—4,0	4—16	16—64
Нитрофурантоин	4—16	4—16	–
Ко-тримоксазол (1/19)	<0,5/9,5	<0,5/9,5	8/152—32/608
Примечание: данные приведены для методов серийных разведений в бульоне			

Таблица 11

Значения величин диаметров зон ингибиции роста (мм) для референтных штаммов

Антибиотики	Содержание в диске, мкг	E. coli ATCC 25922	S. aureus ATCC 25923	P. aeruginosa ATCC 27853
Ампициллин	10	16—22	27—35	–
Цефтибутен	30	27—35	–	–
Цефотаксим	30	29—35	25—31	–
Цефтриаксон	30	29—35	22—28	17—23
Налидиксовая к-та	30	22—28	–	–
Норфлоксацин	10	28—35	17—28	22—29
Ципрофлоксацин	5	30—40	22—30	25—33
Офлоксацин	5	29—33	24—28	17—21
Ломефлоксацин	10	27—33	23—29	22—28
Амикацин	30	19—26	20—26	18—26
Гентамицин	10	19—26	19—27	16—21
Нетилмицин	30	22—30	22—31	17—23
Тобрамицин	10	18—26	19—29	19—25
Канамицин	30	17—25	19—26	–
Хлорамфеникол	30	21—27	19—26	–
Тетрациклин	30	18—25	24—30	–
Доксициклин	30	18—24	23—29	–
Рифампин	5	8—10	26—34	–
Нитрофурантоин	300	20—25	18—22	–
Ко-тримпоксазол (1/19)	1,25/23,75	24—32	24—32	–

7. Питательные среды, реактивы, консерванты. Порядок контроля качества питательных сред

7.1. Питательные среды

Транспортные среды:

1 %-я пептонная вода, pH 8,5 ± 0,1 без ингибиторов роста сопутствующей флоры и с теллуритом калия (см. среды обогащения);

2 %-й раствор поваренной соли: 20 г хлорида натрия и 0,1 г едкого натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды; жидкость пропускают через бумажный фильтр, разливают по 10 мл в пробирки и стерилизуют в автоклаве 20 мин при 0,7 атм.

Среды обогащения

а) Основной раствор пептона готовят по следующей прописи:

Пептон сухой	– 100,0
Натрия хлорид	– 50,0
Калия нитрат	– 10,0
Натрия карбонат	– 25,0
Дистиллированная вода	– 1 л

pH 8,4 ± 0,1.

В холодную дистиллированную воду погружают пептон, хлорид и карбонат натрия. Смесь кипятят при постоянном помешивании до полного растворения пептона, не допуская его пригорания, затем добавляют нитрат калия. Проверяют реакцию среды, если нужно, pH доводят до 8,5 ± 0,1. Раствор фильтруют через миткалевый или бумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют в автоклаве 20 мин при 1 атм.

Основной раствор пептона сохраняется до 2 лет.

б) 1 %-я пептонная вода.

Для получения 1 %-й пептонной воды концентрированный раствор разводят в 10 раз дистиллированной водой. После установления pH 8,5 ± 0,1 разливают в пробирки или во флаконы и стерилизуют 20 мин при давлении 0,7 атм.

Можно готовить 1 %-ю пептонную воду и непосредственно из отдельных компонентов, взяв навески в 10 раз меньше указанных в рецепте основного пептона. Технология приготовления такая же, как и основного пептона.

в) Пептонная вода с теллуритом калия.

В 1 %-ю пептонную воду (pH 8,5 ± 0,1) после автоклавирования добавляют теллурит калия в конечном разведении 1 : 100 000 или 1 : 200 000. Предварительно готовят рабочий 0,1 %-й раствор теллурита калия(1 : 1 000). Срок хранения рабочих растворов 7 дней.

Плотные среды для выделения холерных вибрионов

Щелочной мясо-пептонный агар:

Мясная вода	– 1 л
Пептон	– 10,0
Натрия хлорид	– 5,0
Агар-агар	– 20,0

pH 8,0 ± 0,2.

В мясную воду вносят пептон и хлорид натрия. Смесь перемешивают и подщелачивают 20 %-м раствором едкого натра до pH 8,3 ± 0,1. Затем добавляют агар-агар и содержимое помещают в автоклав для варки среды в начале текучим паром в течение 30—40 мин, а затем при 1 атм 20 мин. Если мясо-пептонный агар варят на плите, среду кипятят до полного расплавления агар-агара при постоянном помешивании.

Для получения прозрачной агаровой среды ее после варки с целью отстоя на 2—3 ч оставляют в автоклаве или помещают в термостатную комнату при температуре (43 ± 2) °С, лучше время отстоя продлить до 18—20 ч. Отстоявшийся агар осторожно, не взбалтывая, сливают с осадка на плотный ватно-марлевый фильтр. В фильтрате уточняют реакцию среды, если требуется, подкисляют её, но подщелачивать агар на данном этапе не рекомендуется во избежание выпадения осадка при стерилизации готовой среды. Профильтрованный агар разливают в посуду и стерилизуют при 1,0 атм 20 мин.

Элективные среды

Рекомендуется использовать питательную среду для выделения холерных вибрионов элективно-дифференциальную, сухую (СЭДХ).

Среда обладает выраженными элективными свойствами, обеспечивая ингибицию сопутствующей микрофлоры (энтеробактерий, протея, кокков и др.) и практически не влияет на рост вибрионов. Холерные вибрионы О1 и не О1 групп через 12—18 ч формируют на этих средах плоские, прозрачные колонии желтого цвета за счет ферментации сахарозы, диаметром 1,0—2,0 мм; V. parahaemolyticus – мелкие, голубоватые (цвета среды) с уплотненным центром; V. alqinolyticus – крупные, желтые; колонии Pseudomonas, Aeromonas – голубые, Enterobacteriaceae – очень мелкие, плотные или полупрозрачные, иногда окрашены в желтый цвет; колонии протея, как правило, не роятся.

Среды для идентификации вибрионов

а) Среды с углеводами для отбора колоний:

Среда Ресселя

Пептон	– 5,0
Натрия хлорид	– 5,0
Лактоза	– 10,0
Глюкоза	– 1,0
Агар-агар	– 10,0
Индикатор Андреде	– 40 мл
Вода дистиллированная	– 1 л

pH 7,3 ± 0,1.

Среду варят, фильтруют, разливают по 5—7 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при давлении 0,5 атм 20 мин. Готовую среду после стерилизации скашивают так, чтобы получить столбик и косяк. Среда светлая.

Среду можно готовить на 1,0—1,3 %-м питательном агаре, добавляя к нему в соответствующих концентрациях углеводы и индикатор Андреде.

Лактозо-сахарозная среда

Готовится как и среда Ресселя, но вместо глюкозы берут сахарозу в том же количестве.

Среда Клиглера:

1,5—1,7 %-й мясопептонный агар или другой слабощелочной питательный агар	– 1 л
Лактоза	– 10,0
Глюкоза	– 1,0
2 %-й раствор серно-кислого закисного железа	– 10,0 мл
0,8 %-й раствор тиосульфата натрия	– 10,0 мл
0,4 %-й раствор сульфата натрия	– 10,0 мл
1 %-й раствор фенолового красного	– 24,0 мл

pH 7,3 ± 0,1.

Вначале в расплавленном питательном агаре (pH 7,7 ± 0,1) растворяют углеводы, затем к нему добавляют свежеприготовленные растворы железа и солей натрия согласно прописи среды (индикатор на сероводород). Кроме того, для регистрации кислотообразования добавляют индикатор феноловый красный. Среду варят, фильтруют, разливают по 5—7 мл в стерильные пробирки, стерилизуют 20 мин при давлении 0,5 атм и скашивают по типу среды Ресселя; pH готовой среды 7,3 ± 0,1; цвет красный.

Маннозо-сахарозная среда

1,5 %-й питательный агар	– 1 л
Манноза	– 1,0
Сахароза	– 10,0
Серно-кислое железо ($FeSO_4$)	– 0,2
Гипосульфит натрия ($Na_2SO_3 \cdot 5H_2O$)	– 0,08
Сульфит натрия (Na_2SO_3)	– 0,4
0,2 %-й феноловый красный	– 10,0

После расплавления pH среды довести до 8,0, разлить в пробирки по 5—7 мл и стерилизовать при 0,7 атм 15 мин. Готовую среду после стерилизации скашивают так, чтобы получить столбик и косяк.

б) Среды для идентификации.

Среды Гисса

К 100 мл 1 %-й пептонной воды (pH 7,3 ± 0,1) без селитры добавляют 0,5—1,0 % необходимого углевода или спирта (L-арабиноза, D-манноза, D-сахароза, D-маннит, L-инозит, D-глюкоза, растворимый крахмал и др.) и 1 % индикатора Андреде или 0,1 мл 1,6 %-го раствора бромтимолового синего. Среды разливают в стерильные пробирки с поплавками и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин; среду с L-арабинозой следует стерилизовать в течение 20 мин при 0,1—0,2 атм. Для приготовления сред Гисса можно применять только перечисленные изомеры углеводов. Готовые среды Гисса с индикатором Андреде светлые, при кислотообразовании краснеют. Среды с бромтимоловым синим зеленого цвета с травянистым оттенком, при кислой реакции – жёлтого цвета, при щелочной – синего.

Среда Хью-Лейфсона

Пептон	– 2,0
Натрия хлорид	– 5,0
Двузамещённый фосфат калия	– 0,3
Глюкоза	– 10,0
Бромтимоловый синий	– 0,03
Агар-агар	– 3,0
Дистиллированная вода	– 1 л

pH 7,1 ± 0,1.

К воде добавляют пептон, натрия хлорид и агар-агар. Смесь подогревают до расплавления агара, затем вносят фосфат калия и глюкозу, продолжают кипятить 2—3 мин. Смесь подщелачивают 20 %-м раствором едкого натрия до pH 7,4 ± 0,1, доводят объем среды до первоначального и добавляют 3 мл 1 %-го водного раствора бромтимолового синего. Затем среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 4—5 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при давлении 0,5 атм 20 мин. Цвет среды до стерилизации синий, а после автоклавирования травянисто-зеленый, pH 7,1 ± 0,1. При кислой реакции среда желтеет.

Бульон Кларка

Пептон	– 5,0
Глюкоза	– 5,0

Двузамещенный фосфат калия – 5,0
Дистиллированная вода – 1 л

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

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

Среда с желатиной. К мясопептонному бульону или бульону Хоттингера прибавляют мелко нарезанную желатину из расчета 10,0—15,0 г на 100 мл (летом концентрацию желатины увеличивают до 20 %). Желатине дают набухать в течение 30 мин и затем растворяют при медленном нагревании в водяной бане при температуре (45,0 ± 5,0) °С. Устанавливают pH 7,1 ± 0,1, прибавляя к расплавленной желатине 10 %-й раствор двууглекислого натрия. При более щелочной реакции желатина застывает плохо, а иногда и совсем не застывает. В 1 л растворенной желатины вносят для просветления два взбитых с небольшим количеством дистиллированной воды яичных белка. Смесь перемешивают и прогревают текучим паром в течение 20 мин до полного свертывания белка и просветления среды. Затем среду фильтруют в горячем состоянии через бумажный или ватно-марлевый фильтр с большой поверхностью. Среду, разлитую по 5—8 мл в пробирки, стерилизуют при давлении 0,5 атм 20 мин. После стерилизации среду охлаждают путем погружения пробирок в холодную воду в строго вертикальном положении, чтобы верхняя часть столбика при застывании оставалась совершенно ровной.

Среда для определения декарбоксилаз и дигидролаз аминокислот

Пептон – 5,0
Дрожжевой экстракт – 25,0 (сухой 3,0)
Глюкоза – 1,0
Натрия хлорид – 5,0
Натрия карбонат – 0,1
Бромтимоловый синий
(0,1 %-й раствор в 20 %-м спирте) – 45,0 (0,045 г сухого)
Аминокислота – 10,0—20,0
Дистиллированная вода – 1 л
pH 6,4 ± 0,1.

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

Мясо-пептонный бульон: мясная вода с 1 % сухого пептона и 0,85 % поваренной соли. Смесь кипятят до полного растворения пептона и соли, устанавливают нужную реакцию среды, стерилизуют при 0,7 атм 20 мин.

7.2. Реактивы

а) Для определения образования индола

Реактив Эрлиха:

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

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

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

б) Для выявления образования сероводорода

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

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

в) Для определения нитратредуктазы

Готовят отдельно два раствора. Первый – путем растворения при нагревании в фарфоровой ступке в 20 мл дистиллированной воды 0,2 мг альфа-нафтиламина ($C_{10}H_7NH_2$). Жидкость осторожно вливают в 150 мл 12 %-го раствора уксусной кислоты. Второй – 0,5 г сульфаниловой кислоты ($C_6H_4NH_2S0_3H$) растворяют в 150 мл 12 %-й уксусной кислоты.

Затем оба раствора сливают в темную склянку с хорошо притертой пробкой. Реактив Грисса должен быть бесцветным, если он розовеет, то им не пользуются.

Сложность приготовления реактива Грисса, дефицитность и токсичность входящих в него компонентов (в частности, альфа-нафтиламина) ограничивают возможности его применения. Этих недостатков лишен метод с использованием риванолового реактива, представляющего собой смесь равных объемов 0,1 %-го раствора риванола в дистиллированной воде и 12 %-го раствора соляной кислоты. В случае положительной реакции культура испытуемого штамма, выращенная в бульоне или 1 %-й пептонной воде с 0,1 %-м KNO_3, окрашивается в красный цвет.

г) Для определения β-галактозидазной активности приготавливают М/75 раствор орто-нитрафенил – β-Д-галактопиранозида (ОНФГ):

ОНФГ – 80 мг
Дистиллированная вода – 75 мл
Фосфатный буфер – 5 мл

Растворяют в дистиллированной воде при 37 °С ОНФГ, затем добавляют раствор однозамещенного фосфорно-кислого натрия ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$). Доводят pH до 7,0. Раствор должен быть бесцветным – хранят при температуре –4 °С. Перед использованием раствор выдерживают в течение нескольких минут до растворения фосфата, который на холоде кристаллизируется.

7.3. Консерванты для сохранения дефибринированной крови

а) Консервант с борной кислотой

Борная кислота – 40,0 г
Глюкоза – 50,0 г
0,9 %-й раствор натрия хлорида – до 1 л.

Стерилизуют на водяной бане или текучим паром при 100 °С – по 20 мин в течение 3-х дней.

Соединяют 100 мл дефибринированной крови барана с 15 мл консерванта с борной кислотой.

б) Консервант Алсевера

Сахароза (или глюкоза)	– 20,5
Хлористый натрий	– 8,0
Цитрат натрия	– 4,2
Дистиллированная вода	– до 1,0 л

pH – 6,1 доводится 10 %-м раствором лимонной кислоты.

Стерилизуют на водяной бане или текучим паром при температуре 100 °С по 20 мин в течение 3-х дней.

Консервант Алсевера и дефибринированную кровь соединяют поровну. Консервированную кровь хранят при температуре (4 ± 1) °С.

7.4. Порядок контроля качества питательных сред

Питательные среды, консерванты, ингибиторы посторонней микрофлоры, используемые в диагностике холеры, подлежат обязательной проверке в соответствии с действующими инструктивно-методическими документами.

Бактериологический контроль качества плотных и жидких питательных сред могут проводить лаборатории противочумных и других учреждений, имеющие разрешение на работу с возбудителем холеры, применяя для контроля тест-штаммы Vibrio cholerae P-1 (145) и Vibrio cholerae eltor M-878, а также лаборатории особо опасных инфекций учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, с использованием тест-штамма авирулентного холерного вибриона не О1 серогруппы Р-9741 в порядке, определяемом действующими методическими указаниями по контролю питательных сред.

Бактериологическому контролю подлежит каждая серия сухой среды производственного выпуска, имеющая номер государственной регистрации, лицензии на ее производство и соответствующий срок годности, а также среды лабораторного изготовления.

На контроль направляют часть общего объема среды, предназначенного для проведения исследований, в количестве 200 мл агара и 100 мл основного раствора пептона производственного выпуска и в двойном объеме для серий лабораторного изготовления. В направлении следует указать название среды, предприятие-изготовитель, номер серии и срок годности сухой среды, дату контролируемой варки. Транспортируемые образцы должны быть надежно упакованы, флаконы с жидкой средой закрыты резиновыми пробками.

Оптимальный срок проверки питательной среды 10—14 дней после приготовления.

При положительном результате контроля пробы соответствующая серия сухой среды считается пригодной к использованию. Последующий контроль этой серии среды осуществляется ежегодно, а также при изменении условий приготовления сухой среды, независимо от времени предыдущей проверки.

Если при первом контроле среда оказалась непригодной, необходим повторный бактериологический контроль этой же серии сухой среды, при этом на контроль необходимо направлять образец новой варки и навеску сухой среды этой же серии.

При получении отрицательного результата повторного контроля среды, приготовленной на месте, и положительного бактериологического контроля образца этой же серии сухой среды, сваренного в лаборатории контролирующего учреждения, следует

считать пригодной данную серию сухой питательной среды и принять меры к выяснению и устранению ошибки в технологии местного изготовления.

При получении отрицательного результата на образец сухой среды данной серии направляют рекламацию в адрес учреждения-изготовителя и ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Сроки хранения щелочного агара и основного раствора пептона производственного выпуска (сухая среда и приготовленные из неё образцы) указаны в инструкции предприятия-изготовителя по применению среды.

Для сред лабораторного изготовления определены следующие сроки хранения:

- для щелочного агара – 6 месяцев с момента изготовления и первичного контроля, по истечении этого срока допускается переконтроль и продление срока годности ещё на 3 месяца;
- для основного раствора пептона – 2 года с контролем качества среды после приготовления, затем спустя 1,0—1,5 года хранения.

Срок хранения 1 %-й пептонной воды при герметичной упаковке (резиновые пробки и металлические колпачки) – 2 месяца, а после переконтроля возможно продление срока хранения на 1 месяц.

Питательные среды, готовые к употреблению, хранят в тёмном прохладном месте (6—20 °С), не допуская перепада температур больше чем на 5 °С. Подъем и снижение температур губительно действуют на биологические свойства сред.

Щелочной агар и основной пептон, контролируемые авирулентным тест-штаммом холерного вибриона, подлежат периодической перепроверке по согласованию с территориальными лабораториями и противочумными учреждениями на базе последних вирулентными тест-штаммами. Ежегодному контролю в территориальном противочумном учреждении подлежит также теллурит калия.

8. Методы серологической диагностики

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

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

У больных холерой на 5—7-й день от начала заболевания появляются агглютинины, вибриоцидные антитела и антитоксины.

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

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

Если кровь забирают в день постановки реакции, пробирки со свернувшейся кровью необходимо центрифугировать 10—15 мин при 3 000 об./мин. При отсутствии возможности исследовать сыворотку немедленно, ее сохраняют в ампулах при температуре (4,0 ± 0,5) °С. Кровь из пальца берут в объеме 0,4 мл и вносят в стерильный пенициллиновый флакон или пробирку с 1,6 мл 0,9 %-го раствора хлорида натрия (1 : 5).

8.1. Определение агглютининов в сыворотке крови

А. Обнаружение противохолерных антител методом развернутой реакции агглютинации. Исследуемую сыворотку разводят 1 %-й пептонной водой pH 7,5 ± 0,1 в объеме 1 мл от 1 : 10 до 1 : 640. В качестве антигена используют 3-часовую бульонную культуру, выделенную в данном очаге, или исследуют в 3-х рядах с культурами холерных вибрионов (сероваров Огава, Инаба и О139 серогруппы). В пробирку с растительной сывороткой вносят по 1 капле культуры-антигена и ставят на 1 ч в термостат, затем до утра в холодильник при температуре (4,0 ± 0,5) °С, после чего отмечают результаты. Реакция сопровождается контролями антигена и сыворотки.

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

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

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

Б. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с диагностикумом эритроцитарным холерным антигенным

Для выявления полных антител в сыворотке крови предназначена РНГА. Это достаточно специфичная и чувствительная двухкомпонентная реакция. По чувствительности значительно превосходит реакцию агглютинации. Необходимые ингредиенты, методика постановки в макро- и микрообъемах изложены в наставлении к диагностикуму эритроцитарному холерному антигенному.

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

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

В. Реакция нейтрализации антигена (РНАг)

Для выявления антител в сыворотке крови с использованием диагностикума эритроцитарного холерного иммуноглобулинового служит РНАг. Реакция нейтрализации антигена – высокоспецифическая трехкомпонентная реакция. Ее принцип заключается в специфической нейтрализации добавляемого антигена как полными, так и неполными антителами, которые появляются ранее других. Необходимые ингредиенты, методика постановки в макро- и микрообъемах изложены в инструкциях по применению к диагностикуму эритроцитарному холерному иммуноглобулиновому.

При использовании системы реакций РНГА и РНАг отпадает необходимость в постановке контроля специфичности с каждой исследуемой сывороткой, т. к. эти две реакции взаимно контролируют полученные результаты.

Результат исследования сыворотки больного в РНАг в разведении 1 : 50 (1 : 80) и выше считается ориентировочно положительным.

Диагностическое значение имеет не менее чем 4-кратное нарастание титров антител при исследовании парных сывороток в РНГА и РНАг.

8.2. Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови (РВА)

Вибриоцидные антитела в крови больных обнаруживаются и достигают максимальных значений 10^{-4}—10^{-8} к 10—12 дню. Принцип метода во всех его вариантах заключается в том, что в присутствии вибриоцидных антител не происходит размножение холерных вибрионов.

При проведении серологических исследований в очаге, обусловленном возбудителем холеры определенного серовара, в реакции используют один штамм соответствующего серовара, при отсутствии этих данных – два штамма обоих сероваров.

Материалы и оборудование

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

Методика постановки реакции

Комплемент, разведенный 0,9 %-м раствором хлорида натрия 1 : 20, разливают в два ряда пробирок по 0,9 мл. В первую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки и после тщательного перемешивания последовательно переносят по 0,1 мл до разведения 10^{-10}, получая десятикратные разведения сыворотки в объеме 0,9 мл. Титрацию сыворотки проводят на льду, который помещают в любую емкость.

Из односуточной агаровой культуры холерного вибриона готовят взвесь в 0,9 %-м растворе хлорида натрия, содержащего в 1 мл 1—2×10^4 м.к. Стерильной градуированной пипеткой полученную взвесь по 0,1 мл вносят в опытные пробирки с растительной сывороткой.

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

Штатив с пробирками на 1 ч помещают в водяную баню или термостат при температуре (37,0 ± 0,5) °С, сделав предварительно высев из пробирки контроля культуры на 2 пластинки щелочного агара для определения фактической концентрации живых вибрионов в опытной суспензии (контроль разведения).

Через 1 ч штатив вновь ставят на лед и из каждой пробирки отдельной стерильной пипеткой 0,1 мл культуры высевают на чашку с щелочным агаром pH 7,0 ± 0,1. Посев равномерно распределяют по поверхности чашки покачиванием или шпателем. Чашки помещают на 18—24 ч в термостат при температуре (37,0 ± 0,5) °С, после чего подсчитывают количество выросших колоний.

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

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

Пример вычисления: при посеве из опытных пробирок с разведением сыворотки 10^{-1}; 10^{-2};. 10^{-3}; 10^{-4}; 10^{-5}; 10^{-6}; 10^{-7} и т. д. на чашках соответственно выросло 0; 0; 5; 10; 15; 30; 38 и т. д. колоний. При высеве из пробирки контроля комплемента также после часовой инкубации при температуре (37,0 ± 0,5) °С выросло 36 колоний, 50 % от этого числа будет составлять 18. Из 5-й пробирки выросло 15 колоний, т. е. меньше 50 % от

количества колоний в контроле (18), в следующей – 30, т. е. более 50 % этого же показателя. Разведение сыворотки в 5-й пробирке составляет 10^{-5}, следовательно, вибриоцидный титр в данном примере будет составлять 10^{-5}.

Определение вибриоцидных антител (ВА) в сыворотке крови на основе ферментации углеводов

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

Материалы и оборудование:

- инактивированная сыворотка крови;
- штаммы холерного вибриона серовара Огава и Инаба;
- комплемент, разведенный 1 : 20 1 %-й пептонной водой, содержащей 1 % сахарозы и 1 % индикатора Андреде;
- термостат на (37,0 ± 1) °С.

Методика постановки реакции

Комплемент, разведенный 1 : 20 1 %-й пептонной водой с сахарозой и индикатором Андреде разливают в пробирки по 0,45 мл. В первую пробирку добавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки и после тщательного перемешивания переносят 0,05 мл смеси во вторую пробирку, из второй в третью и т. д. (до разведения 10^{-5}—10^{-9}). Готовят суспензию 18—20-часовой агаровой культуры холерного вибриона и разводят 1 %-й пептонной водой до концентрации 10^3 м.к./мл. Во все пробирки вносят по 0,45 мл суспензии и помещают в термостат.

Постановку реакции сопровождают следующими контролями:

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

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

Примечание. Для постановки РВА при холере, обусловленной холерным вибрионом О139 серогруппы, не может быть использован выделенный в очаге штамм в связи с возможной чувствительностью его к комплементу. В этих случаях рекомендуется предложенный специалистами Ростовского НИПЧИ, ctx^- клон холерного вибриона О139, направленный на депонирование в Государственную коллекцию патогенных бактерий «Микроб» (РосНИПЧИ «Микроб»).

8.3. Определение токсиннейтрализующих антител в сыворотке крови

Для выявления токсиннейтрализующих антител в сыворотке крови больных холерой и вибриононосителей предназначена РНГА с эритроцитарным холерным энтеротоксическим диагностикумом (ЭХЭД), у которых инфицирование обусловлено холерными вибрионами О1 и О139 серогрупп. Токсиннейтрализующие антитела появляются на 5—7-й день болезни, достигая максимума на 14—21-й день, затем их титр постепенно снижается, но сохраняется дольше других антител. Иммуноглобулины к холерному токсину, в сравнении с вибриоцидными и другими специфическими холерными антителами, дольше циркулируют в сыворотке крови после перенесенной инфекции (до 8—10 и более месяцев). Условно положительным титром РНГА с ЭХЭД следует считать 1 : 160 и выше. Целесообразно исследовать парные сыворотки.

Результат РНГА с ЭХЭД позволяет сделать заключение о токсигенности (эпидемичности) циркулирующего в очаге штамма холерного вибриона, в том числе и без выделения культуры.

Приложение 1
(рекомендуемое)

Направление проб от людей

в лабораторию _____

для исследования на _____

от «_____» _____200___ г.

№ регистрационный *	№ пробы	Первичная или повторная	Характер материала	Фамилия, И., О.	Возраст	Диагноз	Адрес места жительства	Место работы	Время отбора пробы	Примечание**
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

* Регистрационный номер проставляют в лаборатории.
** Указать принимал (а) ли антибиотики; если да, то какие, когда и сколько.

Пробы отбирали: _____

_____

_____

(Фамилия, И., О., должность) (Подписи)

Пробы доставил _____

(Фамилия, И., О., должность) (Подпись)

Время доставки проб_____

(дата, время – часы, минуты)

Приложение 2
(рекомендуемое)

Направление проб из объектов окружающей среды

в лабораторию _____

для исследования на _____

от «_____» _____200___ г.

№ регистрационный *	№ пробы	Место отбора проб	Объект для исследования	Характер материала	Объем (количество)	Время отбора пробы (ч., мин)
1	2	3	4	5	6	7

* Регистрационный номер проставляют в лаборатории.

Пробы отбирали: _____

_____

_____

(Фамилия, И., О., должность) (Подписи)

Пробы доставил _____

(Фамилия, И., О., должность) (Подпись)

Время доставки проб _____

(дата, время – часы, минуты)

Приложение 3
(обязательное)

Укладка
для отбора материала от больного с подозрением на холеру для больничного учреждения неинфекционного профиля, станций скорой и неотложной помощи, поликлиник, СКО, СКП, ПСКП

1.	Банки широкогорлые с крышками или притертыми пробками, емкостью не менее 100 мл	2 шт.
2.	Контейнеры 100—200 мл с завинчивающейся крышкой стерильные, полипропиленовые	2 шт.
3.	Стеклянные трубки с резиновой грушей для переноса жидкого исследуемого материала в контейнеры	2 шт.
4.	Контейнеры для испражнений 30 мл с ложкой, полипропиленовые	2 шт.
5.	Пробирки с ватными тампонами или алюминиевыми петлями (стерильные)	2 шт.
6.	Клеенка медицинская подкладная	1 м
7.	Полиэтиленовые пакеты	5 шт.
8.	Салфетки марлевые	5 шт.
9.	Направление на анализ (бланк)	3 шт.
10.	Лейкопластырь	1 уп.
11.	Карандаш простой	1 шт.
12.	Карандаш по стеклу	1 шт.
13.	Бикс (металлический контейнер)	1 шт.
14.	Инструкция по забору материала	1 шт.
15.	Хлорамин в пакетах по 30 г, рассчитанный на приготовление 1 литра 3 %-го раствора	1 шт.
16	Хлорная известь сухая в пакете из расчета 200 г на 1 кг выделений	1 шт.
17.	Перчатки резиновые	2 пары
18.	Емкость эмалированная 10 л	1 шт.
19.	Пептонная вода 1 %-я во флаконах по 50 мл, закрытых резиновыми пробками и завальцованных металлическими колпачками	4 шт.
20.	Флаконы с 50 мл 0,9 %-го раствора хлорида натрия, закрытые резиновыми пробками и завальцованные металлическими колпачками	2 шт.

Приложение 4
(обязательное)

Укладка
для забора проб из объектов окружающей среды на холеру

1.	Ящик тарный на 20 гнезд	1 шт.
2.	Ящик металлический – укладка	1 шт.
3.	Бутылки 0,5 л с ватно-марлевыми (и резиновыми) пробками, с пергаментными бумажными колпачками	20 шт.
4.	Флаконы с 50 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, закрытые резиновыми пробками и завальцованные металлическими колпачками	2 шт.
5.	Спирт 96 °	100 мл
6.	Вата	100 г
7.	Карандаш по стеклу	2 шт.
8.	Карандаш простой	1 шт.
9.	Бумага писчая	10 листов
10.	Направление на анализ (бланк)	10 шт.
11.	Бумага копировальная	5 листов
12.	Пинцет	1шт.
13.	Банка 0,5 л с матерчатыми салфетками (15 шт.) для отбора проб сточных вод	1 шт.
14.	Термометр до 50 °С	1 шт.
15.	Бумага индикаторная для определения pH (1—12)	1 упак.
16.	Банка с притертой крышкой с ватными тампонами	1 шт.
17.	Пробирки с тампонами для взятия смывов	20 шт.
18.	Штатив на 20 гнезд	1 шт.
19.	Батометр	1 шт.
20.	Шпагат – мотки по 5, 10 и 30 м	45 м
21.	Хлорамин в пакетах по 30 г, рассчитанный на приготовление 1 литра 3 %-го раствора	2 шт.
22.	Емкость на 1 л для приготовления 3 %-го хлорамина	1 шт.
23.	Пакеты полиэтиленовые	5 шт.
24.	Халат медицинский и шапочка	2 шт.
25.	Перчатки резиновые	2 пары
26.	Фартук и нарукавники клеенчатые	1 шт.

Приложение 5
(рекомендуемое)

Способ отбора колоний вибрионов с помощью стереоскопического микроскопа в косо проходящем свете

Принцип метода заключается в том, что при просмотре колоний различных микробов под малым увеличением микроскопа или лупы при освещении их пучком света, косо падающим на поверхность агара, колонии приобретают способность светиться и кажутся окрашенными.

К стереоскопическому микроскопу МБС-2 или МБС-1 приспосабливают устройство для получения узкого пучка света и зеркало от микроскопа на подвижном шарнире для освещения чашки снизу под углом 45—50°.

Чашки с посевами просматривают после 12—18 ч инкубации. При величине угла падения луча света к поверхности агара в 40—50° колонии вибрионов по своей окраске заметно отличаются от других микроорганизмов.

Цвет колоний, выросших на щелочном агаре, при косом освещении:

Микроорганизмы	Цвет колонии
Холерные вибрионы	Преобладает серо-голубой с оттенком зеленовато-серым, синевато-зеленым, реже – зеленый с верхним краем красно- бурого или коричневого оттенка
Сальмонеллы	Розовый оттенок
Шигеллы	Розовый с фиолетовым оттенком
Кишечная палочка	Ярко-красный
Протей	Красный с фиолетовым оттенком

Приспособления для просмотра колоний в косо проходящем свете.

1. Столик стереоскопического микроскопа МБС-1 или МБС-2 заменяют специальным приспособлением для освещения чашки снизу под углом 45—50°. Источником света служит осветитель от микроскопа, на который надевают кожух с отверстием диаметром 5 мм против спирали лампочки для получения узкого пучка света. Узкий пучок света направляют в центр вогнутого зеркала, которое перемещается на подвижном шарнире поворотом винта в зависимости от необходимости угла падения света. Угол вычисляют по соотношению расстояния от зеркала до чашки, которое меняется произвольно, и расстояния от чашки до поверхности стола, остающегося неизменным.

Для удобства исследования осветитель и зеркало можно вмонтировать в ящик со стеклянной крышкой, на которую помещают чашку с посевом. Это дает возможность быстро находить нужный угол падения света, передвигая зеркало поворотом винта по вмонтированной шкале.

2. Приспособление, смонтированное из основных узлов стереоскопического микроскопа БМС-1 и прибора для счета колоний.

Из раструба верхней крышки прибора для подсчета колоний удалить оба стекла вместе с упорным кольцом и снять верхнюю крышку. Из скобы передней панели вывинтить вертикальную ось, после чего убрать диск со светофильтрами. Освободить два винта, прикрепляющие патрон лампочки освещения к кронштейну на задней панели. В

крышку снизу вставить вертикальную штангу от узла лупы с таким расчетом, чтобы в рабочем положении прибора муфта с прижимным винтом оказалась на дне под кронштейном импульсного счетчика. В муфту зажать держатель с угловыми губками (из комплекта лабораторного штатива), предварительно укороченный до 110 мм. Держателем закрепить патрон с лампочкой в вертикальном положении. Крышку фиксировать винтами на своем обычном месте.

Штатив микроскопа МБС-1 вместе с бинокулярной насадкой отсоединить от столика и установить непосредственно на корпус прибора для счета колоний так, чтобы 3 сферических ножки основания штатива охватили раструб крышки прибора, а окно основания было обращено к наблюдателю. Подлежащие к просмотру чашки с посевами устанавливают над открытым окном. Нужную освещенность и угол падения света находят изменением положения лампы, которое достигается поворотом штанги, после чего последнюю фиксируют цанговым зажимом.

Приложение 6
(рекомендуемое)

Журнал
регистрации микробиологических исследований материала от больных (трупов) людей с подозрением на холеру и другие карантинные инфекции

№ регистрационный	Фамилия, И., О.	Возраст	Пол	Место работы, должность	Место жительства (адрес)	Клинический (патолого-анатомический) диагноз	Учреждение, направляющее пробу	Цель исследования	№, дата первичного анализа (год, месяц, число)	Применение антибиотиков	Дата и время		Исследуемый материал	Результаты исследования	Дата направления ответа (месяц, число)	Подпись врача
											взятия пробы (год, месяц, число, час)	приема анализа (месяц, число, час)				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

Приложение 7
(рекомендуемое)

Журнал
регистрации микробиологических исследований проб из объектов окружающей среды

№ регистрационный	Объект исследования	Адрес, место отбора проб	Количество (объем) пробы	Наименование учреждения, направившего пробы	Дата и время			Результат исследования	Подпись
					отбора пробы (год, месяц, число, час)	приема пробы (месяц, число, час)	выдачи ответа (месяц, число, час)		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Приложение 8
(рекомендуемое)

Журнал
идентификации культур холерных вибрионов

№ регистрационный	№ штамма	Вид микроба	Дата выделения (число, месяц, год)	Объект исследования	Морфология клетки	Подвижность	Морфология колоний	Индофенолоксидаза	Лизиндекарбоксилаза	Орнитиндекарбоксилаза	Аргининдигидролаза	Расщепление глюкозы в среде Хью-Лейфсона		Ферментация				
												аэробное	анаэробное	сахарозы	арабинозы	маннозы	маннита	инозита
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

Продолжение журнала

Ферментация			Образование			Взаимодействие с холерными иммуноглобулинами в реакциях							Чувствительность к фагам холерным					Реакция гемагглютинации	Чувствительность к полимиксину В 50 ед./мл	Гемолитическая активность в пробе Грейга
						агглютинации					РНГА, РТПГА	МФА								
лактозы	крахмала	желатины	индола	сероводорода	ацетилметилкарбинола	О1	Огава	Инаба	РО	О139			классическому	эльтор	ctx^+	Ctx^-	ТЭПВ 1—7			
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

Продолжение журнала

Токси-ген-ность	ПЦР		ДНК-зондирование на ctx АВ	Чувствительность к антибиотикам													Заключение*	Подпись врача
				диско-диффузионный метод							метод серийных разведений							
на кроликах-сосунках	ctx AB	tcp A		тетрациклин	левомицетин	доксициклин	ципрофлоксацин	нитрофурантин	ко-тримоксазол	другие (вписать)	тетрациклин	левомицетин	доксициклин	ципрофлоксацин	нитрофурантоин	ко-тримоксазол		
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59

Примечание: *

– таксономическое определение, токсигенность с указанием метода определения, чувствительность к антибиотикам (значения МПК, мкг/м);

– при необходимости дифференциации от других видов патогенных вибрионов добавляют тесты: рост без NaCl; расщепление салицина, дульцита, целлобиозы, тест на β-галактозидазу, наличие нитратредуктазы.

Приложение 9
(обязательное)

Журнал учета выделенных штаммов микроорганизмов (форма № 513/у)

Хранить 3 года

до ☐☐ ☐☐ ☐☐

начат ☐☐ ☐☐ ☐☐

окончен ☐☐ ☐☐ ☐☐

№ п/п	№ анализа	Адрес и дата взятия пробы	Наименование ПБА*	№ штамма	Источник выделения	Дата выделения	Краткая характеристика ПБА**	Судьба ПБА***	Примечание
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

* Патогенный биологический агент.

** Типичность; при атипичности указать отличительные признаки.

*** Уничтожен (дата, № акта); передан в коллекцию, центр и т. д. (дата, № акта)

Приложение 10
(обязательное)

Паспорт штамма

Вид микроба_____ Штамм № _____

Ф., И., О._____ возраст _____

место жительства больного или вибриононосителя (подчеркнуть) _____

_____

(республика, область, район, населенный пункт, улица, №№ дома и квартиры)

Наименование объекта _____

(река, озеро, и т. п.)

наименование стационарной точки _____

(зона сан. охраны, место сброса сточных вод и т. п.),

сточные воды _____

(в очаге, коллектор, очистные сооружения до или после очистки и т. п.),

другие объекты _____

(указать)

с указанием территории _____

(республика, область, район, населенный пункт)

Дата забора материала _____ Дата выделения культуры_____

Культуру выделил (а) _____

(Ф., И., О. врача, учреждение)

Культуру подтвердил (а) _____

(Ф., И., О. врача, учреждение)

Характеристика штамма

1. Морфология клеток _____

Тинкториальные свойства _____

2. Подвижность _____

3. Культуральные свойства: на 1 % п.в. _____

на щелочном агаре _____

4. Проба на оксидазу _____

5. Лизиндекарбоксилаза _____

орнитиндекарбоксилаза _____ аргининдигидролаза _____

6. Расщепление: глюкозы в среде Хью-Лейфсона (аэробн./анаэробн.) _____

сахарозы _____, маннозы_____, арабинозы _____, маннита _____,

инозита_____, лактозы_____, крахмала _____

7. Протеолитическая активность _____

8. Агглютинабельность холерными сыворотками (указать серии и титр сывороток):

О1 _____, Огава _____, Инаба _____,

РО _____, О139 _____

9. Реакция с холерными О1 люминесцирующими антителами _____

10. Чувствительность к холерным фагам: классическому _____, эльтор _____,

ctx^+_____, ctx^-_____, ТЭПВ (1—7) _____

11. Гемолитическая активность по Грейгу _____

12. Реакция гемагглютинации _____

13. Чувствительность к полимиксину В 50 (ед/мл) _____

14. Токсигенность:

комплексным методом (ctx фаги и гемолиз) _____

на кроликах-сосунках _____

ПЦР _____

ДНК-зондирование _____

15. Антибиотикограмма

№ п/п	Препарат	Значение		Результат		
		МПК, мкг/мл	зона ингибиции роста, мм	чувствительный	промежуточный	устойчивый
1	Доксициклин					
2	Тетрациклин					
3	Левомицетин					
4	Ципрофлоксацин					
5	Рифампицин					
6	Нитрофурантоин					
7	Ко-тримоксазол					
8	Гентамицин					
9	Ампициллин					
10	Цефотаксим					
	Другие (вписать)					

16. Другие свойства_____

17. Среда хранения _____

Подпись врача _____

Примечание.

1) В графе 8 указывать: отр. или до титра; $^1/_2$ титра и т. д.

2) В графе 10 указывать: до титра; $^1/_2$ титра и т. д.

gost.e-ecolog.ru