

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
здравоохранения -
Главный государственный
эксперт-эпидемиологический врач

Республики Беларусь
В.И. Качан

03 2010г.

Депонированный № 084-0370



ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ КОКЛЮШЕ И
ПАРАКОКЛЮШЕ
Инструкция по применению

Учреждение разработчик: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Авторы: В.Л. Колодкина, Т.Н. Денисевич.

Минск - 2010

2
ГЛАВА 1
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению предназначена для специалистов бактериологических лабораторий органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный контроль, научно-исследовательских институтов и других органов здравоохранения для совершенствования лабораторной диагностики коклюша.

2. В настоящей Инструкции по применению изложены стандартные методы индикации и идентификации *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica*.

ГЛАВА 2
ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

3. Несмотря на резкое снижение заболеваемости и летальности коклюша, достигнутое в результате массовой специфической профилактики, проблема борьбы с этой инфекцией остается актуальной и в настоящее время.

Отсутствие стойкого иммунитета к коклюшу в сочетании с высоким индексом восприимчивости (70 - 90%) способствуют заболеванию не только детей, но и взрослых.

Другой особенностью эпидемического процесса коклюша является возникновение периодических подъемов заболеваемости на фоне высокого охвата прививками детей раннего возраста. Это объясняется недостаточной напряженностью и длительностью поствакцинального иммунитета, создаваемого прививками АКДС-вакциной, что способствует накоплению значительного числа неиммунных лиц к семилетнему возрасту. Иммунитет после перенесенного заболевания или вакцинации утрачивается после 10-15 лет. И как результат этого *B.pertussis* может являться причиной респираторного заболевания детей старших возрастов и взрослых. Коклюш у привитых лиц протекает в виде легких и стертых форм инфекции, которые диагностируются в основном серологически, ретроспективно. За годы специфической профилактики их количество увеличилось до 95% случаев. Треть заболевших пациентов не обращается к врачу, т.к. нет существенного нарушения самочувствия. В связи со снижением тяжести течения инфекции и преобладанием легких и стертых форм болезни (95%), диагностика коклюша сильно затруднена. Лишь тщательное наблюдение за динамикой болезни, учет эпидемиологической обстановки и бактериологическое исследование позволяют диагностировать коклюш при стертом и легком его течении.

Затруднения в диагностике коклюша привели к неполной регистрации случаев заболевания и занижению истинного показателя заболеваемости.

4. Имеет распространение и паракоклюшная инфекция, которая регистрируется только при применении бактериологической диагностики. Сходство клинических проявлений коклюша и паракоклюша затрудняет их дифференциальную диагностику, а, следовательно, выявление и учет.

ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБОВ РОДА *BORDETELLA*

5. Таксономия. Род *Bordetella* назван в честь Ж. Борде (J. Border), который совместно с О. Жангу (O. Gengou) описал бактерию в 1906 году. Типовой представитель рода *B.pertussis* первоначально назван *Haemophilus pertussis*. В дополнение к *B.pertussis* род включает *B.bronchiseptica*, *B.parapertussis*, *B.avium*, *B.hinzii*, *B.holmesii* и *B.trematum*. Филогенетический анализ, основанный на сиквенсе гена 16S rRNA показал, что *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica* и *B.holmesii* являются близко родственными.

Все микроорганизмы рода *Bordetella* являются грамотрицательными коккобациллами. Некоторые виды являются подвижными. Строгие аэробы с оптимальной температурой роста 35 - 37°C. Окисляют и метаболизируют аминокислоты, но не ферментируют углеводы. Несмотря на то, что все виды имеют относительно простую потребность в питательных веществах, различия в привередливости зависят от степени чувствительности к токсическим субстанциям и метаболитам, найденных в общепринятых лабораторных средах. *B.pertussis* является наиболее прихотливым видом и ингибируется компонентами, присутствующими во многих средах, включая жирные кислоты, ионы металлов, сульфиды и пероксиды. Изоляция *B.pertussis* требует содержания в среде таких протективных субстанций как уголь, кровь или крахмал. Другие виды рода *Bordetella* менее прихотливы и хорошо растут на агарах, содержащих кровь. Скорость роста представителей рода *Bordetella* обратно пропорциональна прихотливости; *B.pertussis* растет медленно, тогда как *B. avium* и *B. bronchiseptica* растут быстро. *B. bronchiseptica*, *B. avium* способны расти в фосфатно-буферном растворе и пресной воде, которые теоретически могут являться источниками инфекции.

У бордетелл выделяют общие (родовые) и специфические (видовые) антигены; общие антигены опосредуют агглютинацию бактерий гомологичными и гетерологичными неадсорбированными сыворотками (коклюшными и паракоклюшными). Видовые антигены (агглютиногены) обозначают как факторы: 1 для *B.pertussis*, 12 для *B. bronchiseptica* и 14 для *B. parapertussis*.

Дифференциальная характеристика микроорганизмов рода *Bordetella* представлена в приложении 1 к настоящей инструкции по применению.

6. Факторы патогенности. *B.pertussis* продуцирует ряд факторов вирулентности, ответственных за патогенез коклюша. Факторы вирулентности включают токсины (коклюшный токсин (далее –КТ), аденилат циклазный токсин, трахеальный цитотоксин) и компоненты, которые обуславливают адгезию к мерцательному эпителию дыхательных путей (филаментозный гемагглютинин (далее – ФГА), фимбрии и пертактин). К другим факторам вирулентности относятся дермонекротический или термолабильный токсин, липополисахарид (эндотоксин) и фактор колонизации трахеи. Другие представители рода *Bordetella* также экспрессируют факторы вирулентности. *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* продуцируют пертактин и филаментозный гемагглютинин. Структурные гены коклюшного токсина представлены в геномах *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*, но не экспрессируются.

7. Среда обитания. *B.pertussis* вызывает заболевание только у человека, который является основным резервуаром возбудителя. *B. parapertussis* вызывает заболевание у человека, но также был найден у овец. Однако показано, что *B.parapertussis*, вызывающая респираторное заболевание овец, не способна вызывать соответствующее заболевание у человека. Анализ геномов штаммов, выделенных от человека и овец, показал, что они различные. *B.pertussis* исторически считался строго патогеном респираторного тракта, вызывающего поражение мерцательного эпителия бронхов. Однако его выявление в альвеолярных макрофагах и в крови указывает на возможность вызывать инвазивную инфекцию. *B.bronchiseptica* является патогеном, вызывающим респираторные заболевания у разных животных, включая собак, свиней, кошек, кроликов. *B.avium* выявлена у птиц и вызывает ринотрахеиты у индюков. *B.hinzii* колонизирует респираторный тракт домашней птицы, но не вызывает у них заболевания. Редко *B.bronchiseptica* и *B.hinzii* вызывают заболевание и у человека. Также от человека изолированы подобные *B.avium* микроорганизмы, а некоторые респираторные и нереспираторные заболевания ассоциируются с *B.holmesii* и *B.trematum*. Недавно *B.holmesii* был выделен из назофарингеальных образцов больных с коклюшеподобными симптомами.

8. Характеристика *B.pertussis*. Мелкие кокковидные грамтрицательные палочки с закругленными концами(0,2-0,5 x 0,5-2 мкм), биполярно окрашенные. Жгутиков, спор нет. Имеют микрокапсулу и пили. Облигатные аэробы, хемоорганотрофы. Имеют О-антиген. *B. pertussis* имеет восемь агглютиногенов, ведущими из которых является 1,2,3. В зависимости от наличия ведущих агглютиногенов, принято выделять четыре серотипа (1.2.0; 1.0.3; 1.2.3 и 1.0.0). Чувствительны к физическим и химическим факторам. Плохо переносят высушивание (выживают часы в сухой мокроте). Низкая температура быстро приводит к гибели. При 56°C сохраняются 20-30 минут. Ультрафиолет вызывает гибель за минуты.

ГЛАВА 4 ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

9. Показания к лабораторному исследованию.

Бактериологическое исследование проводят с диагностической целью и по эпидемиологическим показаниям.

С диагностической целью обследуются:

дети с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания по клиническим показаниям;

дети, которые кашляют в течение 14 и более дней независимо от указаний на контакт с больным коклюшем или паракоклюшем;

взрослые с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания;

взрослые, у которых кашель продолжается в течение 14 дней и более, независимо от указаний на контакт с больным коклюшем или паракоклюшем.

Обследованию по эпидпоказаниям подлежат лица, общавшиеся с больным коклюшем и паракоклюшем.

10. Обследование с диагностической целью должно быть проведено двукратно, ежедневно или через день на 1 - 3 неделях болезни. При обследовании в более поздние сроки высеваемость возбудителя резко снижается. Обследование по эпидпоказаниям проводят также двукратно.

Взятие аспиратов и мазков из верхних дыхательных путей для бактериологического исследования на коклюш должны осуществлять медицинские работники (врач, фельдшер, медицинская сестра, лаборант) после соответствующего инструктажа.

11. Бактериологический метод является высоко специфическим диагностическим тестом, так как выделенные изоляты могут быть генотипированы и проанализированы на антибиотикочувствительность. Чувствительность же бактериологического метода широко варьирует и зависит от ряда факторов, включая факторы, связанные с больным (использование антибиотикотерапии, длительность симптомов, возраст и вакцинальный статус), условий транспортировки образца, типа и качества используемой питательной среды и других факторов. В то время как тестирование в ПЦР также подвержено этим факторам, бактериологический метод подвержен в большей степени в связи с необходимостью выделения живых микробов. Наибольший успех в изоляции возбудителя достигается при заборе материала в конце инкубационного периода, в течение катаральной стадии и в начале пароксизмальной стадии заболевания. Уровень изоляции обратно коррелирует с увеличением возраста (высокий уровень у младенцев; низкий уровень у взрослых), с эффективностью проведенной противомикробной терапии (макролиды, ко-тримоксазол, и тетрациклин, но не пенициллин или ампициллин) и с числом полученных доз вакцины больным (низкий уровень изоляции у полностью

вакцинированных лиц). Наибольший уровень изоляции микробов достигается, когда посев взятого материала проводится немедленно после его забора.

12. Взятие, транспортировка и хранение образцов для лабораторных исследований. Результат исследования в значительной степени зависит от своевременного и правильного взятия материала. Материалом для исследования является слизь из верхних дыхательных путей, осаждаемая при кашле на задней стенке глотки. Слизь с задней стенки глотки забирают натошак или через 2 - 3 часа после еды. Взятие материала проводится аспирацией, с помощью заднеглоточного (предпочтительнее носоглоточного) тампона или методом кашлевых пластинок. При правильном взятии мазка в материале содержится реснитчатый эпителий, к которому бордетеллы проявляют тропизм. Носоглоточные аспираты имеют преимущества перед мазками, так как содержат достаточно материала для исследования. Ротоглоточные мазки имеют второстепенное значение для бактериологического исследования, так как они не содержат реснитчатый эпителий и содержат большое число представителей нормальной флоры, которая доминирует при культивировании на среде выделения. Согласно последним экспериментальным данным ротоглоточные мазки могут использоваться для ПЦР диагностики.

Для получения носоглоточного аспирата стерильный узкий катетер вставляется через ноздрю к задней стенке носоглотки. Шприц подсоединяется к другому концу катетера и осуществляется всасывание. Содержимое шприца помещается в стерильную пробирку. Оставшийся на стенках катетера секрет смывается в ту же пробирку фосфатным буфером. Пробирка доставляется в лабораторию не позднее 4-х часов с момента забора.

Заднеглоточный тампон используют для взятия материала, как с диагностической целью, так и по эпидпоказаниям. При этом необходимо следить за прочной фиксацией ваты на металлическом стержне. Для взятия материала используют как сухой, так и увлажненный тампоны, которые должны быть изогнуты под тупым углом до стерилизации.

Для изготовления увлажненного тампона сухой ватный тампон дважды с небольшим интервалом (2 - 5 мин) погружают в буферную смесь или полужидкий казеиново-угольный агар (далее - КУА). Эти тампоны могут храниться несколько дней. Преимуществом увлажненных тампонов является возможность посева материала не на месте забора, а в лаборатории, но не позднее 3 - 4 часов с момента его взятия. Этот метод освобождает сотрудников от необходимости перевозки чашек с питательной средой к месту взятия материала.

Методика взятия носоглоточного мазка через рот: после фиксации языка шпателем тампон заводят под мягкое нёбо за маленький язычок вверх и проводят стерильным тампоном по задней поверхности носоглотки.

При выполнении данной процедуры стараться не прикасаться к языку или слизистым щек. Одновременно рекомендуется использовать два тампона: сухой и увлажненный. Сначала материал забирают сухим тампоном, а затем - смоченным забуференным физиологическим раствором. Материал, взятый с помощью сухого тампона, необходимо сразу засеять на питательные среды, а посев влажного тампона можно произвести уже в лаборатории.

Методика взятия носоглоточного мазка через нос: осторожно вводят тампон через ноздрю в носоглотку, придерживаясь перегородки носа и дна носового хода. Быстрым вращательным движением тампон извлекают.

Техника забора материала из носоглотки представлена в приложении 2 к настоящей инструкции по применению.

Материал, взятый сухим тампоном можно помещать в одну из доступных транспортных сред: Regan-Lowe, Casamino Acids, Amies с углем, что обеспечивает транспортировку мазков в течение 24, максимум 48 часов.

Для приготовления тампонов лучше в качестве материала использовать альгинат кальция или дакрон. Вата содержит ингибиторы, которые снижают уровень изоляции *V.pertussis*.

Для исследования материала в ПЦР предпочтительнее использовать мазок, взятый сухим тампоном из дакрона.

После взятия мазки следует хранить при +4⁰С. При транспортировке мазков следует оберегать их от прямых солнечных лучей и низкой температуры (промерзания). Оптимальная температура транспортировки составляет +4⁰С (допускается транспортировка в температурных пределах от +4⁰С до +37⁰С).

Метод кашлевых пластинок используют только с диагностической целью при наличии кашля. Для этого во время кашля снимают крышку с чашки Петри и подносят чашку со средой ко рту кашляющего на расстоянии 10 - 12 см, чтобы отдельные мелкие капельки слизи из дыхательных путей попали на поверхность питательной среды. Чашку в таком положении держат в течение 5 - 6 кашлевых толчков. Необходимо следить, чтобы на чашку не попала слюна, рвотные массы, мокрота. Затем чашку закрывают и доставляют в лабораторию. Взятие материала кашлевыми пластинками, кроме медицинского персонала, могут проводить родители после соответствующего инструктажа.

Каждой пробирке с исследуемым материалом придается номер. На материал, направляемый в лабораторию, должно быть оформлено направление, где указывается:

- наименование учреждения, направившего материал для исследования;
- ФИО, возраст, домашний адрес обследуемого;
- причина обследования;
- дата заболевания;

дата и время взятия материала;

наименование материала и метод взятия его;

должность, фамилия и подпись лица, взявшего материал.

Бактериологический метод исследования предусматривает выделение возбудителя заболевания путем посева на плотные питательные среды, выделение чистой культуры, идентификацию возбудителей рода *Bordetella* до вида. В связи с медленным ростом возбудителя коклюша бактериологическое исследование продолжается в течение 5 - 7 суток. Предварительный ответ может быть выдан на 3 - 5 сутки, окончательный - 5 - 7-е сутки.

13. Ход бактериологического исследования:

первый день. Посев материала, взятого тампоном, производят последовательно на 1-2 чашки с питательной средой, предварительно обработанной антибиотиком для подавления сопутствующей микрофлоры. Для этого в среду можно добавить пенициллин. Однако часть сопутствующей флоры остается из-за устойчивости к пенициллину. Метициллин превосходит пенициллин по ингибирующему действию на назофарингеальную микрофлору, но антибиотиком выбора является цефалексин, так как в отличие от пенициллина и метициллина он более активен в отношении сопутствующей микрофлоры. Обработку антибиотиками можно проводить двумя способами: а) путем нанесения его на поверхность питательной среды, б) путем добавления в среду, как описано в главе 5 настоящей Инструкции по применению. Для получения изолированных колоний, посев материала производят путем тщательного втирания его тампоном вначале по периферии среды чашки Петри в виде 4-5 площадок, а затем Z - образным штрихом в центре чашки. Та же методика посева применяется на второй чашке. Стерильным шпателем растирают центральные части посева, не касаясь площадок.

Засеянные чашки (тампоном или кашлевые пластинки) помещают в термостат при температуре 35-37° С на 3 суток (72 часа). Для увлажнения воздуха в термостат ставят сосуд с водой. Увлажнение должно быть достаточным для предотвращения высушивания агара в течение длительной инкубации.

Несколько сред используется для изоляции бордетелл. Это традиционные среды на основе картофельного отвара (среда Борде-Жангу) или угля (среда Regan – Lowe), синтетическая среда на казеиновой основе - казеиново-угольный агар (КУА), обогащенные глицерином, пептоном и кровью. Оптимальным считается добавление лошадиной, бараньей или кроличьей крови, использование человеческой крови дает худшие результаты. Питательные среды могут быть изготовлены в бактериологической лаборатории из необходимых ингредиентов, как описано в главе 5 настоящей Инструкции по применению, или получены в готовом виде. К среде Regan – Lowe возможно добавление вместо крови или

в дополнение к ней сыворотки крупного рогатого скота (5%) и среды № 199 (1%).

Четвертый день. С целью отбора подозрительных колоний рода бордетелл выросших на чашках с питательной средой колонии просматривают визуально и с помощью микроскопа бинокулярного стереоскопического (МБС)

Колонии микробов рода бордетелл при росте на плотных питательных средах выпуклые, влажные, гладкие, блестящие с ровными краями, серого цвета с голубоватым, жемчужным или металлическим, а иногда желтоватым или беловатым оттенком. Колонии имеют маслянистую консистенцию и легко снимаются с поверхности среды. При стереоскопической микроскопии можно наблюдать узкий луч света (хвостик), отходящий от центра колонии. Колонии *B.parapertussis* очень похожи на *B.pertussis*, но серее и менее выпуклы. *B.bronchiseptica* может образовывать колонии аналогичные *B.pertussis*, а также более плоские с приподнятым центром.

Сроки выявления колоний различны: колонии *B.bronchiseptica* появляются через 18-24 часа, *B.parapertussis* – через 24-48 часов, *B.pertussis* – через 48-72 часа. Различная скорость роста отражается на величине колоний при просмотре их через 72 часа. На средах, содержащих кровь *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica* образуют зоны слабого гемолиза.

Рост *B.pertussis* и *B.bronchiseptica* на питательной среде не сопровождается изменением ее цвета. *B.parapertussis* при обильном росте на среде КУА вызывают диффузное окрашивание среды в буровато-коричневый цвет, что выявляется при просмотре в проходящем свете, а также вызывают потемнение среды с кровью (за счет активности тирозиназы).

При наличии на среде выращивания подозрительных колоний производят выделение чистой культуры, путем отсева их на скошенный КУА или в чашки Петри с одной из питательных сред. При этом поверхность среды делят на несколько секторов и отсевают каждую колонию на отдельный сектор, тщательно втирая ее в среду круговыми движениями.

При наличии значительного количества однотипных подозрительных колоний после выделения чистой культуры, из оставшихся колоний делают мазки в физиологическом растворе, определяют морфологию культуры при окраске по Граму. Одновременно определяют также отсутствие спонтанной агглютинации. Микробы рода *Bordetella* имеют вид мономорфных мелких овоидных палочек (коккобактерий), равномерно располагаются в мазке, грамотрицательны. Иногда *B.parapertussis*, особенно на среде Борде-Жангу, могут иметь вид удлинённых полиморфных палочек.

Культуру из оставшихся колоний проверяют в реакции агглютинации на стекле со специфическими видовыми неадсорбированными

сыворотками, разведенными 1:10 и по возможности с адсорбированными монорецепторными сыворотками к агглютиногенам (факторам) 1 и 14. Если число подозрительных колоний значительно, то возможна постановка пробы Заксе для определения наличия фермента уреазы.

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

При отсутствии роста подозрительных колоний на средах выращивания чашки Петри вновь помещают в термостат на 24-48 часов и просматривают повторно в соответствующие сроки.

Пятый – шестой – седьмой день. Просматривают посеvy, произведенные для выделения чистой культуры, и отмечают изменения цвета среды: *V.parapertussis* диффузно окрашивают среду выращивания (КУА) в буровато-коричневый цвет.

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

Дополнительно для идентификации используют специфические сыворотки. Ставят реакцию агглютинации на стекле со специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками, разведенными 1:10, а также с адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам 1 и 14.

Серотипирование: коклюшные микробы определяют агглютинацией с монорецепторными сыворотками к факторам 1,2,3.

Виды рода *Bordetella* могут быть идентифицированы на основании биохимических тестов, основанных на различиях фенотипических характеристик.

Для анализа биохимических свойств производят посеvy чистой культуры на агарозную среду с тирозином (определяется наличие тирозиназы), определяется наличие уреазы пробой Заксе или посевом на бульон Хоттингера с мочевиной. При подозрении выделенной чистой культуры на *V.bronchiseptica* определяют утилизацию цитрата на среде Симмонса и подвижность путем посева на среду полужидкий агар (0,5% агар-агара).

V.pertussis биохимически инертна: не растет на мясо-пептонном агаре, не изменяет цвета агарозной среды с тирозином, не имеет фермента уреазы (проба Закса отрицательная), не утилизирует цитраты.

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

B. bronchiseptica отличается быстрым ростом на простых питательных средах, подвижностью, не изменяет цвета среды с тирозином, способна утилизировать цитраты на среде Симмонса.

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

Рекомендуемое время инкубации - 7 дней. В одном исследовании 12 дней инкубации выявляло больше изолятов, чем инкубация в течение 7 дней.

Если в течение семи суток на среде выращивания не обнаружены колонии подозрительные для бактерий рода *Bordetella*, наблюдение прекращают и выдают окончательный отрицательный ответ.

Схема бактериологического исследования представлена в приложении 3 к настоящей Инструкции по применению.

14. Определение уреазной активности. Смесь реактивов А (1 часть) и Б (19 частей) разливают по 0,1- 0,2 мл в стерильные агглютинационные пробирки с пробками и вносят 1-3 петли испытуемой культуры. Пробирки помещают в термостат при 35-37°C на 30 минут. Учет результатов производят после культивирования, а при отсутствии изменения цвета смеси пробирки оставляют при комнатной температуре и результат учитывают на следующий день. Одновременно ставят контроль реактива без внесения культуры. При наличии у микробов фермента уреазы происходит расщепление мочевины до аммиака, что приводит к защелачиванию среды, изменяя ее цвет с желтой на малиновый.

15. Определение утилизации цитратов. Делают посев испытуемой культуры на скошенный агар среды Симмонса. Пробирки инкубируют при 37°C одни сутки. Цитрат ассимилирующие бактерии хорошо растут, подщелачивают среду и вызывают окрашивание ее в синий цвет. Микробы, не ассимилирующие цитраты на этой среде, не растут и не меняют ее цвета.

16. Определение пигментообразования. Производят посев выделенной культуры на простой питательный агар с 0,1% тирозина в течение суток при 37° С. При расщеплении тирозина среда окрашивается в желто-коричневый цвет.

17. Иммунофлюоресцентный метод для выявления возбудителя коклюша ВОЗ не рекомендует использовать в связи с высокой частотой ложноположительных и негативных результатов.

18. Выявление нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР). Во многих лабораториях выявление нуклеотидных последовательностей возбудителей коклюша в ПЦР заменило

иммунофлюоресцентный метод и даже стало первичным диагностическим тестом. Центр по контролю за заболеваемостью рекомендует использовать ПЦР как предположительный тест в тесной связи с бактериологическим методом. ПЦР обеспечивает быстрый результат, что важно для лечения больного и контроля вспышек. ПЦР более чувствительна, чем иммунофлюоресцентный и бактериологический методы. В результате ее высокой чувствительности и способности выявлять ДНК возбудителя ПЦР позволяет получить положительные результаты на поздних стадиях заболевания и на фоне антибиотикотерапии, в отличие от бактериологического метода. Анализ мазков от больных детей, пролеченных эритромицином показал, что после 4 дней лечения 56% и 89% мазков были позитивными в бактериологическом и ПЦР методах соответственно, а после 7 дней лечения бактериологический метод не дал положительных результатов, тогда как ПЦР была позитивной в 56%. Высокая чувствительность ПЦР также отмечается среди лиц со стертыми и атипичными формами заболевания и среди лиц пожилого возраста. Метод ПЦР для диагностики коклюшной и паракоклюшной инфекций разработан в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Разработанный молекулярный метод на основе ПЦР включает 4 независимые ПЦР, позволяющие выявлять и дифференцировать ДНК *V.pertussis*, *V.parapertussis*, *V.bronchiseptica*.

Подготовка образца. Назофарингеальные мазки, взятые сухим ватным тампоном и помещенные в стерильную 1,5 мл пробирку эппендорф, после доставки в лабораторию суспендировать в 300 мкл стерильной бидистиллированной воды, тщательно перемешать на вортексе. Стерильным пинцетом аккуратно удалить тампон, отжимая его о стенки пробирки. Аликвоту образца в объеме 30 мкл прогреть при +95⁰С в течение 15 мин для разрушения клеток и по 5 мкл использовать в ПЦР. Оставшийся исходный материал заморозить при - 20⁰С для последующего анализа.

Реакционная смесь для ПЦР с праймерами IS481 на N пробирок, включая N образцов и контроли:

N исследуемых образцов

1 контроль (положительный) матричная ДНК *V.pertussis*

1 контроль (отрицательный) вода.

2,5 мкл x (N +1) - концентрированного 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X)

3 мкл (исходного 25 ммоль) x (N +1) – MgCl₂ (3 ммоль)

0,5 мкл (исходного 10 ммоль) x (N +1) – ДНТФ (200мкмоль)

1 мкл x (N +1) – праймера ISBPF1 (10 пмоль в 25 мкл)

1 мкл x (N +1) – праймера ISBPR1 (10 пмоль в 25 мкл)

0,5 мкл (исходного 5 ед/мкл) x (N +1) – Таq-полимераза (2,5 ед)

11,5 мкл x (N +1) – H₂O деионизированная.

Разлить ПЦР-смесь по 20 мкл на N пробирок (включая положительный и отрицательный контроли). Маркируют пробирки и переносят в другую (грязную) зону для внесения образца. Отрицательный контроль (H₂O в объеме 5 мкл) вносится в чистой зоне. По 5 мкл образца добавляют в соответствующие маркировке пробирки. Положительный контроль (5 мкл ДНК в концентрации 0,2пг/мкл) добавляют в контрольную пробирку последним. Минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без нагреваемой крышки.

Продолжительность циклов амплификации:

Первый цикл 94°C – 5 минут

35 циклов 94°C – 30 сек

53°C – 20 сек

72°C – 30 сек

Последний цикл 72°C – 5 минут

Для учета результатов ПЦР проводят электрофорез 10 мкл ПЦР-продукта в 1,5% агарозном геле. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. Продуктом реакции является фрагмент ДНК размером 408 п.н. Наличие в положительном контроле полосы, соответствующей фрагменту 408 п.н., и ее отсутствие в отрицательном контроле свидетельствуют о правильно приготовленной реакционной смеси и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Наличие данных, свидетельствующих о коклюше-подобных заболеваниях, обусловленных *V.holmesii*, а также данных о возможном носительстве IS481 некоторыми штаммами *V.parapertussis*, *V.avium*, и *V.petrii* делает необходимым мониторинг специфичности этой мишени. Поэтому позитивный результат на IS481 должен быть подтвержден другой мишенью, специфичной для *V.pertussis*. Все позитивные результаты, выявленные в ПЦР с праймерами к IS481, необходимо исследовать в ПЦР с праймерами BP637 для специфического подтверждения *V.pertussis*.

Реакционная смесь для ПЦР с праймерами BP637 на N пробирок, включая N образцов и контроли:

N исследуемых образцов

1 контроль (положительный) матричная ДНК *V.pertussis*

1 контроль (отрицательный) вода.

2,5 мкл x (N +1) - концентрированного 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X)

3 мкл (исходного 25 ммоль) x (N +1) – MgCl₂ (3 ммоль)

0,5 мкл (исходного 10 ммоль) x (N +1) – ДНТФ (200мкмоль)

1 мкл x (N +1) – праймера BP637F1 (15 пмоль в 25 мкл)

1 мкл x (N +1) – праймера BP637R1 (15 пмоль в 25 мкл)

0,5 мкл (исходного 5 ед/мкл) x (N +1) – Таq-полимераза (2,5 ед)
 11,5 мкл x (N +1) – H₂O деионизированная.

Разлить ПЦР-смесь по 20 мкл на N пробирок (включая положительный и отрицательный контроли). Маркируют пробирки и переносят в другую (грязную) зону для внесения образца. Отрицательный контроль (H₂O в объеме 5 мкл) вносится в чистой зоне. По 5 мкл образца добавляют в соответствующие маркировке пробирки. Положительный контроль (5 мкл ДНК в концентрации 2пг/мкл) добавляют в контрольную пробирку последним. Минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без нагреваемой крышки.

Продолжительность циклов амплификации:

Первый цикл 94°C – 5 минут

40 циклов 94°C – 30 сек

59°C – 20 сек

72°C – 40 сек

Последний цикл 72°C – 5 минут

Для учета результатов ПЦР проводят электрофорез 10 мкл ПЦР-продукта в 1,5% агарозном геле. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. Продуктом реакции является фрагмент ДНК размером 637 п.н. Наличие в положительном контроле полосы, соответствующей фрагменту 637 п.н., и ее отсутствие в отрицательном контроле свидетельствуют о правильно приготовленной реакционной смеси и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Данная ПЦР специфична для *B. parapertussis*.

Реакционная смесь для ПЦР с праймерами IS1001 на N пробирок, включая N образцов и контроли:

N исследуемых образцов

1 контроль (положительный) матричная ДНК *B. parapertussis*

1 контроль (отрицательный) вода.

2,5 мкл x (N +1) - концентрированного 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X)

3 мкл (исходного 25 ммоль) x (N +1) – MgCl₂ (3 ммоль)

0,5 мкл (исходного 10 ммоль) x (N +1) – ДНТФ (200мкмоль)

1 мкл x (N +1) – праймера ISBPF1 (10 пмоль в 25 мкл)

1 мкл x (N +1) – праймера ISBPR1 (10 пмоль в 25 мкл)

0,5 мкл (исходного 5 ед/мкл) x (N +1) – Таq-полимераза (2,5 ед)

11,5 мкл x (N +1) – H₂O деионизированная.

Разлить ПЦР-смесь по 20 мкл на N пробирок (включая положительный и отрицательный контроли). Маркируют пробирки и переносят в другую (грязную) зону для внесения образца. Отрицательный

контроль (H₂O в объеме 5 мкл) вносится в чистой зоне. По 5 мкл образца добавляют в соответствующие маркировке пробирки. Положительный контроль (5 мкл ДНК в концентрации 0,2 пг/мкл) добавляют в контрольную пробирку последним. Минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без нагреваемой крышки.

Продолжительность циклов амплификации:

Первый цикл 94°C – 5 минут

35 циклов 94°C – 30 сек

52°C – 20 сек

72°C – 30 сек

Последний цикл 72°C – 5 минут

Для учета результатов ПЦР проводят электрофорез 10 мкл ПЦР-продукта в 1,5% агарозном геле. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. Продуктом реакции является фрагмент ДНК размером 493 п.н. Наличие в положительном контроле полосы, соответствующей фрагменту 493 п.н., и ее отсутствие в отрицательном контроле свидетельствуют о правильно приготовленной реакционной смеси и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Данная ПЦР позволяет дифференцировать *V.pertussis*, *V.parapertussis*, *V.bronchiseptica*. Дифференциация образцов достигается в результате рестрикционного анализа продукта амплификации фрагмента промотора коклюшного токсина (*ptxA-Pr*) рестриктазой *HaeII*, которая расщепляет ампликоны *V.parapertussis* и *V.bronchiseptica* и не расщепляет ампликоны *V.pertussis*.

Реакционная смесь для ПЦР с праймерами РТ на N пробирок, включая N образцов и контроли:

N исследуемых образцов

1 контроль (положительный) матричная ДНК *V.pertussis*

1 контроль (отрицательный) вода.

2,5 мкл x (N + 1) - концентрированного 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X)

3 мкл (исходного 25 ммоль) x (N + 1) – MgCl₂ (3 ммоль)

0,5 мкл (исходного 10 ммоль) x (N + 1) – ДНТФ (200 мкмоль)

2 мкл x (N + 1) – праймера РТ-F (40,5 пмоль в 25 мкл)

2 мкл x (N + 1) – праймера РТ-R (40,5 пмоль в 25 мкл)

0,5 мкл (исходного 5 ед/мкл) x (N + 1) – Taq-полимераза (2,5 ед)

9,5 мкл x (N + 1) – H₂O деионизированная.

Разлить ПЦР-смесь по 20 мкл на N пробирок (включая положительный и отрицательный контроли). Маркируют пробирки и переносят в другую (грязную) зону для внесения образца. Отрицательный

контроль (H₂O в объеме 5 мкл) вносится в чистой зоне. По 5 мкл образца добавляют в соответствующие маркировке пробирки. Положительный контроль (5 мкл ДНК в концентрации 2пг/мкл) добавляют в контрольную пробирку последним. Минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без нагреваемой крышки.

Продолжительность циклов амплификации:

Первый цикл 94°C – 5 минут

40 циклов 94°C – 30 сек

65°C – 20 сек

72°C – 30 сек

Последний цикл 72°C – 5 минут

Для учета результатов ПЦР проводят электрофорез 10 мкл ПЦР-продукта в 2% агарозном геле. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. Продуктом реакции является фрагмент ДНК размером 239 п.н. Наличие в положительном контроле полосы, соответствующей фрагменту 239 п.н., и ее отсутствие в отрицательном контроле свидетельствуют о правильно приготовленной реакционной смеси и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Рестрикционный анализ. Продукт амплификации (5 мкл) обработать 6 единицами фермента рестрикции *NotI* при 37°C в течение 3 часов в объеме 10 мкл. Для анализа продуктов рестрикции проводят электрофорез 10 мкл образца в 3% агарозном геле. Одновременно в этом же геле анализируют расщепленные и нерасщепленные ДНК *V.pertussis*, *V. paraptussis*, *V.bronchiseptica* как контроли. Присутствие фрагментов расщепления 198 и 41 н.п. характерно для ампликонов *V.paraptussis* и *V.bronchiseptica*.

19. Серологические методы диагностики. Серологическая диагностика коклюша заключается в обнаружении в исследуемой сыворотке специфических антител. При заболевании коклюшем антитела выявляются относительно поздно, между 1 и 2 неделями после начала симптомов у невакцинированных, первично инфицированных лиц. В связи с широкой иммунизацией против коклюша результаты серологических реакций могут иметь диагностическое значение только при изучении их в динамике, исследуя парные сыворотки больного, взятые в начале заболевания с повторным определением содержания антител через 3 - 4 недели. Для выявления антител применяются иммуноферментный метод (далее - ИФА), реакция агглютинации (далее - РА), реакция связывания комплемента (далее - РСК), реакция пассивной гемагглютинации (далее - РПГА), реакция нейтрализации токсина.

Метод ИФА позволяет выявлять иммуноглобулины IgA, IgG, IgM к КТ, ФГА, пертактину и белкам фимбрий. Основным индикатором коклюшной инфекции является выработка IgG и IgA к КТ и ФГА. По

крайней мере, у 90% больных вырабатываются IgG к КТ и ФГА. Выработка IgG к КТ является специфичным для коклюшной инфекции, так как другие представители рода *Bordetella* не экспрессируют КТ. ФГА имеется у *B.pertussis*, и у *B.parapertussis*. Иммунный ответ к пертактину, липополисахариду и белкам фимбрий менее постоянен (от 30 до 60%).

Наиболее специфичными в серодиагностике коклюша являются сероконверсия или четырехкратное нарастание титров IgG к КТ. Альтернативные стратегии серодиагностики менее специфичны и варьируют в зависимости от возраста и вакцинального статуса больного. Для диагностики коклюша у невакцинированных детей показательным является увеличение концентрации IgG и/или IgA к КТ или ФГА, хотя у детей до года IgA могут не вырабатываться. Серодиагностика коклюша у вакцинированных детей более проблематична по причине быстрого увеличения концентрации антител и сложности оценки нарастания титров. У этой группы лиц отличительным признаком инфекции могут являться высокие титры IgA или IgG в одном образце, так как IgA редко обнаруживаются у здоровых вакцинированных лиц. У подростков и взрослых серологический метод диагностики является основным, так как коклюш у них диагностируется поздно и возбудитель инфекции, как правило, не выделяется. Серодиагностика коклюша в этой группе больных преимущественно основывается на выявлении высоких титров антител в одном образце сыворотки, поскольку в большинстве случаев увеличения концентрации антител не наблюдается.

Результат тестирования одной сыворотки, независимо от возраста больного, должен тщательно проверяться, и специфичность результата в таких случаях зависит от конкретно используемой тест - системы.

При использовании РА для серодиагностики коклюша у детей, не привитых против коклюша и не болевших ранее коклюшем и паракоклюшем, наличие специфических антител в титрах 1:80 и выше имеет диагностическое значение. У вакцинированных детей и взрослых положительные результаты РА учитывают только при исследовании парных сывороток крови.

Для дифференциальной диагностики коклюша и паракоклюша РА следует ставить с двумя диагностикумами - коклюшным и паракоклюшным, так как противокклюшная иммунизация вызывает образование в крови антител к возбудителям обеих инфекций.

После перенесенной инфекции или вакцинации уровень антител снижается в течение 1 - 3 лет и утрачивается в течение 10 - 15 лет.

Правила сбора и обработки проб крови для определения антител: кровь в объеме 0,5- 1 мл забирают из пальца или из вены в стерильную центрифужную пробирку. После образования сгустка, сыворотку следует отделить центрифугированием, перенести в стерильную промаркированную пробирку, плотно закупорить и с соблюдением холодовой цепи направить на

исследование в территориальную микробиологическую лабораторию. К каждой сыворотке прилагается заполненная сопроводительная форма, в которой указывается:

Ф.И.О. обследуемого;

дата рождения (день, месяц, год);

адрес; дата вакцинации и ревакцинации.

20. В соответствии с рекомендациями ВОЗ критериями лабораторного подтверждения диагноза коклюша являются: выделение *Bordetella pertussis* или обнаружение последовательностей генома методом ПЦР или положительная серологическая реакция в парных сыворотках

ГЛАВА 5 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

21. Казеиново-угольный агар.

Приготовление гидролизата казеина: для приготовления казеинового гидролизата рекомендуется использовать казеин кислотный технический первого сорта, ГОСТ № 1211-41 и пищевой кислотный ТУ 153-54; активированный древесный уголь осветляющей марки А, ГОСТ № 4453-48 (может быть использован активированный уголь и другой марки); соляную кислоту химически чистую с удельным весом 1,19.

Казеин отмывают 0,2-процентным раствором уксусной кислоты в течение 6-7 дней (25 мл 80-процентной уксусной кислоты на 10 л воды). В первый день раствор меняют три раза, а в последующие 5-6 дней по одному разу в день. Затем казеин промывают дистиллированной водой, хорошо выжимают и высушивают при температуре от 60 до 70 °С или при комнатной температуре.

Гидролизат казеина получают под давлением с помощью крепкой соляной кислоты. Для этого в стеклянной посуде (колба или бутылка емкостью в 2 л) смешивают 400 г казеина, 400 мл соляной кислоты и 200 мл дистиллированной воды. Смесь автоклавируют при 127 °С в течение 3-4 часов. После автоклавирования гидролизат двукратно разводят дистиллированной водой, фильтруют через полотно или бумагу. Затем объем фильтрата доводят дистиллированной водой до 3 л и осветляют активированным углем. Для этого добавляют 50 г угля на 1 л фильтрата. Смесь кипятят в течение 10 мин и пропускают через бумажный фильтр. Из указанного выше количества казеина получается примерно 3 л гидролизата, который представляет собой прозрачную жидкость слегка желтоватого цвета. После фильтрации в готовом гидролизате определяют количество аминного азота методом формольного титрования (методика количественного определения аминного азота приводится ниже). Гидролизат можно хранить при комнатной температуре при добавлении 0,5% хлороформа в течение нескольких месяцев.

Методика определения аминного азота: принцип метода основан на блокировании формальдегидом при $\text{pH} = 7,0$ свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

Реактивы:

едкий натр 0,1 н раствор;

соляная кислота 0,1 н раствор;

формалин (40% раствор формальдегида). Перед каждым определением pH формалина доводят до 7,0.

Ход определения:

для анализа используют определенный объем «В» жидкого образца или раствора сухого образца с содержанием аминного азота 1,5-5 мг. «В» равно для жидких гидролизатов низкой степени расщепления (0,1-0,2% аминного азота) – 3 мл; средней степени расщепления (0,3-0,6% аминного азота) – 1 мл; высокой степени расщепления (0,7-1,3% аминного азота) – 0,5 мл; для жидких питательных сред (0,08-0,14% аминного азота) – 3 мл; для жидких экстрактов (0,02-0,04% аминного азота) – 10 мл. При анализе сухих образцов, таких как сухие гидролизаты, сухие питательные среды, сухие экстракты с содержанием аминного азота 1,5-4,0% аминного азота «В» равно 10 мл 1% раствора (анализируемая навеска образца С составляет 100 мг).

В стакан емкостью 50 мл наливают объем «В» анализируемого раствора образца и доводят общий объем дистиллированной водой до 20 мл. Электроды потенциометра погружают в исследуемый раствор, pH которого доводят до 7,0 с помощью 0,1 н раствора NaOH или 0,1 н раствора соляной кислоты. Во время определения электроды должны оставаться погруженными в раствор. К нейтрализованному раствору добавляют 2 мл нейтрального формалина и, не вынимая электродов, титруют содержимое 0,1 н раствором едкого натра до 9,1. При титровании следует использовать микробюретку на 5 мл.

Содержание аминного азота в исследуемом образце в % (X) вычисляют по формуле.

Для жидкого образца:

$$X_1 = \frac{A \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{V \cdot 1000}$$

где:

A – количество 0,1 н раствора NaOH в мл, пошедшее на титрование испытуемой пробы;

K – поправка к титру 0,1 н раствора NaOH;

1,4 – количество аминного азота в мг, эквивалентное 1 мл 0,1 н раствора NaOH;

100 – коэффициент пересчета в проценты;

V – количество жидкого образца в мл, взятое на анализ;

1000 – коэффициент пересчета мг в г.

Для сухого образца:

$$X_2 = \frac{A \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{C}$$

где:

C – анализируемая навеска сухого образца в мг, содержащаяся втитруемом объеме «В».

Остальные обозначения смотри выше.

Приготовление диализата дрожжей: свежие хлебные дрожжи (прессованные) в количестве 1 кг размешивают в 1 л дистиллированной воды до состояния гомогенной массы, которую переливают в целлофановый мешок, предварительно промытый дистиллированной водой. Мешок завязывают, обмывают под струей водопроводной воды, а затем дистиллированной водой и погружают в эмалированную посуду (кастрюля, бак), в которую предварительно наливают 1,3 л дистиллированной воды. Мешок должен быть полностью погружен в воду. Диализ ведут при температуре от 60 °С до 80 °С в течение 6 часов (за это время количество воды в кастрюле должно уменьшиться примерно в 2 раза). Затем жидкость из кастрюли переливают в стерильную бутыл.

Для повышения выхода диализата можно повторить диализ этих же дрожжей следующим образом: мешок с дрожжами заливают второй раз таким же количеством дистиллированной воды, предварительно нагретой до 70 °С; сосуд, в котором проводится диализ, в целях сохранения тепла накрывают ватником и оставляют на ночь. На следующий день жидкость из кастрюли смешивают с первой порцией, добавляя хлороформ (0,5%) и сохраняют при температуре от 5 °С до 7 °С до 3 месяцев.

Приготовление экстракта дрожжей: свежие хлебные дрожжи (прессованные) в количестве 1 кг суспензируют в 1 л дистиллированной воды, стерилизуют текучим паром (100 °С) в течение 30 мин, затем отстаивают в холодильнике (+4 °С) в течение 5-и суток. Надсадочную жидкость декантируют (осторожно сливают), разливают во флаконы и вновь стерилизуют при 100 °С в течение 30 минут. Последующее хранение дрожжевого экстракта рекомендуют в холодильнике.

Для приготовления 1 л среды КУА необходимы следующие ингредиенты:

Казеиновый гидролизат	- из расчета, чтобы в готовой среде содержалось 130-150 мг% аминного азота (расчет количества гидролизата приводится ниже)
KH_2PO_4	- 0,5 г
$MgCl_2$	- 0,4 г или 2 мл 20% раствора
Крахмал растворимый	- 1,5 г
$CaCl_2$	- 0,01 г или 1 мл 1% раствора
$FeSO_4$	- 0,01 г или 1 мл 1% раствора
$CuSO_4$	- 0,005 г или 1 мл 0,5% раствора

Цистин или цистеин L и LD - формы	- 0,03 г или 2 мл 1,5% раствора
Дрожжевой диализат или дрожжевой экстракт	- 100 мл
Агар-агар ¹	- 22 г
Уголь активированный	- 3г

Количество гидролизата казеина, которое берут для приготовления казеиново-угольного агара, не является постоянным, а меняется в зависимости от содержания в гидролизате аминного азота. Количество гидролизата, которое следует взять для приготовления среды, определяют следующим образом: если, например, в казеиновом гидролизате содержится 800 мг% аминного азота, а в изготавливаемой среде должно содержаться его 150 мг%, то производят расчет:

$$\frac{1000 \text{ мл} \times 150 \text{ мг}\%}{800 \text{ мг}\%} = 187 \text{ мг гидролизата на 1 л}$$

Казеиновый гидролизат и дистиллированную воду (примерно 600 мл) смешивают в эмалированной кастрюле соответствующей емкости и нейтрализуют 20% едким натром до рН 7,0 по бромтимолсинему (до зеленого цвета). Затем вносят навески различных солей по прописи. Крахмал предварительно растворяют в небольшой порции горячей воды и вносят в виде раствора. Агар-агар промывают под струей водопроводной воды в течение нескольких часов или замачивают на 1-2 часа и вносят в смесь, после чего кипятят 10 мин для расплавления агара над пламенем горелки. Затем к смеси добавляют цистин или цистеин, дрожжевой диализат или дрожжевой экстракт. Устанавливают рН 7,3 по компаратору (метанитрофенол), и вносят активированный уголь, тщательно перемешивая. Среду разливают во флаконы или пробирки. Стерилизуют при 110°C в течение 20 мин. Среду во флаконах после стерилизации охлаждают до 45-50 °С, тщательно перемешивают для равномерного распределения угля и разливают по чашкам, а среду в пробирках после охлаждения и перемешивания, скашивают. Оставшуюся впрок среду во флаконах (матрацах) по мере необходимости растапливают в водяной бане или аппарате Коха (текучим паром) до полного расплавления агара. Излишнее прогревание среды не рекомендуется. Готовая среда должна иметь черный цвет, конденсационная вода не должна содержать частиц угля. Среда, разлитая в чашки Петри, хранится в холодильнике в течение недели.

Для улучшения качества питательной среды одновременно с цистином можно добавить 0,03 г на 1 л ее пролина или глутамина.

¹ Качество питательной среды, приготовленной с новой партией агара-агара, обязательно проверяется по методике, указанной ниже.

Методика проверки качества казеиново-угольного агара: в связи с довольно сложным составом казеиново-угольной среды и большой чувствительностью ее к режиму стерилизации, следует периодически проверять качество готовой среды. Для этой цели необходимо пользоваться свежевыделенными культурами коклюшного микроба. В стерильных пробирках делают 8 различных разведений взвеси 2-3-х суточной культуры. Густота взвеси в первой пробирке должна соответствовать 5 млрд микробных тел в 1 мл по стандарту мутности для коклюшных микробов. Во 2-6 пробирки наливают по 4,5 мл стерильного физиологического раствора, в 7-ю наливают 2 мл и в 8-ю – 1 мл. Поверхность одной или двух чашек Петри с испытуемой средой делят на 2-4 или 8 секторов (в зависимости от питательной среды), 0,5 мл взвеси из 1 пробирки переносят стерильной пипеткой во 2 пробирку и этой же пипеткой наносят 0,1 мл взвеси на сектор 1. Другой стерильной пипеткой перемешивают содержимое второй пробирки, переносят из нее 0,5 мл в 3-ю пробирку и 0,1 мл наносят на сектор 2 и т.д. Для каждого разведения следует употреблять отдельную стерильную пипетку, перемешивая ею содержимое пробирки. В 8-ю пробирку переносят из 7-й 1 мл взвеси, также перемешивая стерильной пипеткой и наносят 0,1 мл на сектор 8.

Чашку Петри осторожно, крышкой кверху (чтобы капли не слились) ставят в термостат и выдерживают в течение 3-5 суток. Если среда приготовлена правильно, то на первых трех секторах рост имеет вид сплошных бляшек, на секторах 4,5 и 6 вырастают тесно расположенные колонии, а на секторах 7 и 8 – небольшое количество изолированных колоний. Если нет роста на последних 3 секторах, то средой пользоваться нельзя.

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

В районных лабораториях ЦГЭ можно использовать метод проверки качества питательной среды, предложенный Е.А. Кузнецовым. Посев колонии коклюшного микроба производят на 1/16 поверхности чашки со средой КУА, разлитой в чашки Петри. Всего проверяют 5-10 колоний. Учет роста культуры проводят через 48 часов. В случае роста культуры по всему сектору – среда хорошего качества, при росте на $\frac{1}{2}$ сектора – замедленный рост коклюшного микроба, рост только на посевной площадке – среда плохая.

Схема приготовления разведений коклюшной культуры для проверки качества КУА представлена в приложении 4 к настоящей инструкции по применению.

Питательная среда на основе казеиново-угольного агара:

Сухой казеиново-угольный агар тщательно размешивают в дистиллированной воде, доводят до кипения, автоклавируют 15 мин при 121

°С. Среду перемешивают и добавляют 5-15 мл стерильной (дефибрированной) крови и раствор цефалексина (конечная концентрация 40 мг на 1 л среды) на 100 мл стерильной остуженной среды. Среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри или пробирки. Готовую среду хранить при температуре +2-+8°С.

22. Кровяно-угольный агар (среда Regan – Lowe):

размешать порошок в количестве, указанном в инструкции, в дистиллированной воде. Прокипятить при постоянном помешивании для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при 121°С в течение 15 мин. Остудить до 45-50°С. Асептично внести 50 мл стерильной дефибрированной крови на 500 мл среды и раствор цефалексина (конечная концентрация 40 мг на 1 л среды). Разлить по чашкам Петри. Готовая среда имеет черную окраску, опалесцирует при затвердевании и содержит нерастворимые в воде черные частицы угля. Готовую среду хранить при температуре +2-+8°С.

23. Картофельно-глицериновый агар (среда Борде-Жангу) (приготовление 4 л среды).

Приготовление картофельного отвара: картофель тщательно моют щеткой с мылом, обтирают спиртом и снимают ножом поверхностный слой, тщательно вырезая все почки. Затем картофель промывают дистиллированной водой, нарезают на кусочки и отвешивают требуемое количество в чистую посуду. Картофель в количестве 500 г заливают 1 л дистиллированной воды, варят до неполной готовности, добавляют 4% глицерина и варят до полной готовности. Отстоявшуюся жидкость фильтруют через 6 слоев марли, предварительно промытой и высушенной. К оставшемуся в кастрюле картофелю добавляют небольшое количество горячей дистиллированной воды, встряхивают, дают немного отстояться и фильтруют через тот же фильтр, после чего доводят объем жидкости до первоначального (1 л), добавляя горячую воду (дистиллированную) через тот же фильтр. Картофельный отвар можно готовить впрок, стерилизуя при 120 °С в течение 15 мин.

Приготовление картофельно-глицеринового агара: к 3 литрам дистиллированной воды добавляют 0,75 % химически чистой NaCl (из расчета на 3 л) и 4 % агар-агара (из расчета на все количество среды). Смесь помещают в автоклав, где агар-агар расплавляется текучим паром в течение часа. После отстаивания (в выключенном автоклаве) агар фильтруют через один слой марли, не выливая осадка. Солевой агар (3 части) и картофельный отвар (1 часть) смешивают в горячем виде, разливают во флаконы и однократно стерилизуют при 120 °С в течение 30 мин. Реакцию среды не проверяют.

Перед употреблением к растопленному и остуженному до 45 °С картофельно-глицериновому агару добавляют стерильную дефибрированную кровь в количестве 20-25 % (цитратная и

консервированная кровь непригодна) и раствор цефалексина (конечная концентрация 40 мг на 1 л среды).

24. Приготовление раствора цефалексина (на 1 л среды):

В вышеуказанные питательные среды цефалексин добавляется в виде раствора. Для его приготовления растворить 40 мг цефалексина в 1 мл стерильной дистиллированной/деионизированной воды и довести объем раствора до 10 мл. Тщательно перемешать. Готовый раствор цефалексина можно хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в стерильных пробирках в течение 6 месяцев.

25. Питательный агар с тирозином:

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

26. Приготовление среды Симмонса:

дистиллированная вода – 1 л;

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,0 г;

KH_2PO_4 – 1,0 г;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г;

Na-цитрат – 3,0 г;

агар-агар – 20,0 г.

В половинном количестве дистиллированной воды растворяют фосфорно-кислый аммоний, фосфорно-кислый калий и сернокислый магний. В другой части воды расплавляют агар. Соединяют обе части, предварительно слив с осадка. Добавляют лимоннокислый натрий, нейтральный, устанавливают рН 7,1-7,2. Добавляют индикатор – 1,6 % раствор бромтимолового синего – 9,0 мл. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Приготовление среды Симмонса: препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 7 мл в стеклянные пробирки по ГОСТ 25336-82 Е и стерилизуют автоклавированием при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. При охлаждении среду скашивают, оставляя столбик высотой 2,0-2,5 см. Готовая среда имеет зеленый цвет.

Рост микроорганизмов, утилизирующих цитрат натрия, сопровождается изменением цвета среды из зеленого в синий. Отсутствие роста микроорганизмов, не способных утилизировать цитрат натрия, не приводит к изменению цвета среды.

27. Среда для определения уреазы:

Бульон Хоттингера с мочевиной:

к 100 мл бульона Хоттингера рН = 7,0 добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл 1,6 % спиртового раствора крезолового красного, стерилизуют текучим паром при $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. Посев производят в 1 мл среды петлей, выдерживают 24 часа при $35\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Приготовление реактивов для определения уреазной активности по методу Заксе:

Реактив А:

Мочевина	2,0 г
96% этанол	2,0 мл
Дистиллированная вода	4,0 мл

Реактив В:

0,2 %-ный раствор фенолрот	1,0 мл
Однозамещенный фосфат калия (KH_2PO_4)	0,1 г
Двухзамещенный фосфат калия (K_2HPO_4)	0,1 г
Хлорид натрия (NaCl)	0,5 г
Дистиллированная вода	100,0 мл

Реактив А не стерилизуют и хранят при температуре 4°C. Реактив В стерилизуют в автоклаве текучим паром.

Перед употреблением смешивают 1 часть реактива А и 19 частей реактива В.

28. Среда для определения нитратредуктазной активности:

к 100 мл питательного бульона (МПБ или бульона Хоттингера) рН 7,3-7,5, свободному от нитритов (проверить реактивом Грисса или Касаткина), добавляют 0,1 г свободного от нитритов нитрата калия (KNO_3). Проверяют еще раз на содержание нитритов и разливают по 1 мл в пробирки, предварительно тщательно промытые проточной водой. Среды стерилизуют 15 мин при 121°C.

Реактив Грисса:

раствор 1. 0,8 %-ная сульфаниловая кислота в 5N уксусной кислоте.

раствор 2. 0,6 %-ный диметил-альфа-нафтамин в 5N уксусной кислоте.

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Реактив годен к применению в течение 15 мин, бесцветен, при появлении розового окрашивания - непригоден. Растворы 1 и 2 хранят при 4°C в течение 2 мес.

Реактив Касаткина:

раствор 1. 0,1 %-ый раствор риванола в дистиллированной воде.

раствор 2. 12 %-ный раствор соляной кислоты (HCl).

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Реактив годен к применению в течение 15 мин. Растворы 1 и 2 хранят при 4°C в течение 2 мес.

29. Полужидкий агар для определения подвижности.

сухой питательный бульон (15 г) и агар микробиологический (3 г) растворяют при нагревании в 1000 мл дистиллированной воды. Доводят рН до 7,0-7,2, разливают в пробирки и стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 мин.

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

в конической колбе смешивают 90-95 мл предварительно приготовленного 1/15 м раствора Na_2HPO_4 (11,876 г на 1 л дистиллированной воды) и 5-10 мл раствора KH_2PO_4 (9,078 г на 1 л дистиллированной воды); к этой смеси добавляют 0,5 г агар-агара, стерилизуют при 1 атм 20 мин. Затем в горячую смесь добавляют 0,2 г активированного угля (навеску угля стерилизуют отдельно). Смесь готовят впрок и хранят в холодильнике до 2 месяцев.

Приготовление и стерилизация тампонов:

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

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

31. Наставление для работы с коклюшными культурами необходимыми для проверки качества питательной среды. Коклюшная культура, высушенная из замороженного состояния под вакуумом, может храниться неопределенно долгое время при сохранении вакуума в ампуле и при температуре не выше 10 °С. Ампулу с высушенным штаммом вскрывают стерильно над лотком. Верхний конец ампулы нагревают над пламенем горелки и снимают парафин, затем кусочком стерильной ваты, смоченным в стерильной воде, осторожно прикасаются к оттянутому концу ампулы так, чтобы получилась небольшая трещина и той же мокрой ватой обводят вокруг носика ампулы. После образования круговой (или неполностью круговой) трещины, легким ударом пинцета удаляют конец ампулы.

После вскрытия ампулы в нее стерильно наливают 0,2-0,3 мл стерильного физиологического раствора. После растворения сухого содержимого ампулы его переносят пастеровской пипеткой на чашку с питательной средой и 48-72 часа выращивают при температуре 35-37 °С.

В первых пересевах микробы обладают несколько пониженной жизнеспособностью. Для восстановления полной жизнеспособности

требуется 2-3 пассажа на оптимальных питательных средах. Рекомендуется для работы пользоваться культурой после второго или третьего пересева. В дальнейшем коклюшные культуры сохраняют на среде Борде-Жангу или КУА, пересевая 1 раз в 3-4 недели. Можно пользоваться культурой не более 10 пассажа.

32. Способы длительного хранения (без пересева) культур коклюшного микроба.

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

готовят 2 раствора: первый – 80 % раствор глицерина в буферном физиологическом растворе; второй – сахарозо-желатиновая среда (10 % раствор сахарозы и 1 % раствор желатина). Смешивают по 2 мл первого и второго растворов в стерильных агглютинационных пробирках, помещают на дно пробирки 3-4 петли 3-х суточной культуры коклюшного микроба и хранят в морозильной камере холодильника или в глубоко морозильной камере при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ под ватно-марлевой пробкой до 1 года. При высевах берут петлей часть материала со дна пробирки и высевают на среду КУА с кровью, растирая шпателем.

Приготовление буферного физиологического раствора:

pH 7,2 (на 8 л): NaCl – 69 г 200 мг, Na_2HPO_4 – 15 г 360 мг, KH_2PO_4 – 3 г 520 мг растворяют в 8 л дистиллированной воды, автоклавируют при 0,5 атм в течение 30 мин.

Приготовление сахарозо-желатиновой среды (СЖ):

на водяной бане при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ растворить в 300 мл дистиллированной воды 10 г желатина. Растворить в 300 мл дистиллированной воды 100 г сахарозы. Соединить 1 и 2 раствора, довести дистиллированной водой до 1 л, установить pH 7,0 раствором бикарбоната натрия, стерилизовать текучим паром в автоклаве 3 дня по 1 часу. Хранить разлитым во флаконы.

80 % раствор глицерина стерилизуют в автоклаве при 1,3 атм в течение 30 мин.

Хранение культур коклюшного микроба в полужидком КУА (с кровью и без крови):

казеиново-угольный агар готовится по прописи, но агар-агара добавляют 1 г на 1 л среды (0,1%), разливают по пробиркам (в количестве до 8 мл) и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин. В полужидкий агар КУА можно добавить стерильную дефибрированную кровь крупного рогатого скота, лошади из расчета 0,5-1 мл на 8 мл среды.

Культуру коклюшного микроба засевают в среду, выдерживают в термостате 3-4 дня, а затем без пересева сохраняют в холодильнике или при комнатной температуре в течение 1 мес.

При хранении культуры коклюшного микроба на плотной питательной среде КУА ее пересевают через 10-14 дней.

Допускается использование других коммерческих питательных сред, селективных добавок и других диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN29000. Питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

Приложение 1
к Инструкции по применению
«Лабораторные исследования при
коклюше и паракоклюше»

Дифференциальная характеристика микроорганизмов рода
Bordetella

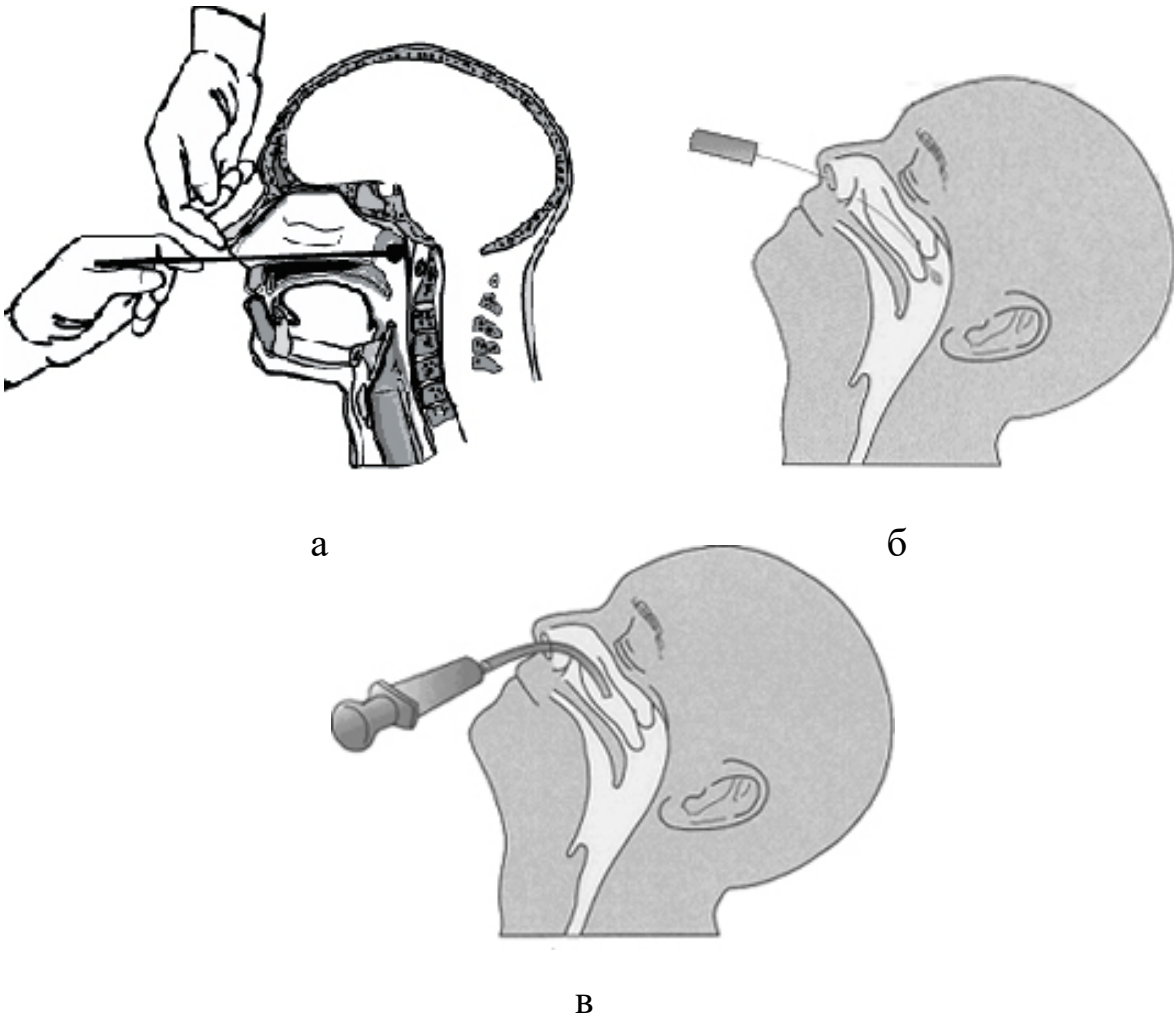
Характеристика	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. trematum</i>
Каталаза	+	+	+	+	+	+ ^a	+
Оксидаза	+	-	+	+	+	-	-
Редукция нитратов	-	-	+	-	-	-	B
Расщепление мочевины	-	+	+	-	B	-	-
		(24 ч)	(4ч)				
Утилизация цитратов (Симмонса)	-	-	+	±	+	-	+
Образование пигмента из тирозина	-	+	-	-	-	+	-
Подвижность, жгутики	-	-	+	+	+	-	+
Рост на питательной среде (дни)	3 - 7	2-3	1	НД	НД	НД	НД
Размер колоний (в мм)	1 - 2	2 - 4	2 - 4	НД	НД	НД	НД

B - вариабелен

НД - нет данных

Приложение 2
к Инструкции по применению
«Лабораторные исследования
при коклюше и паракоклюше»

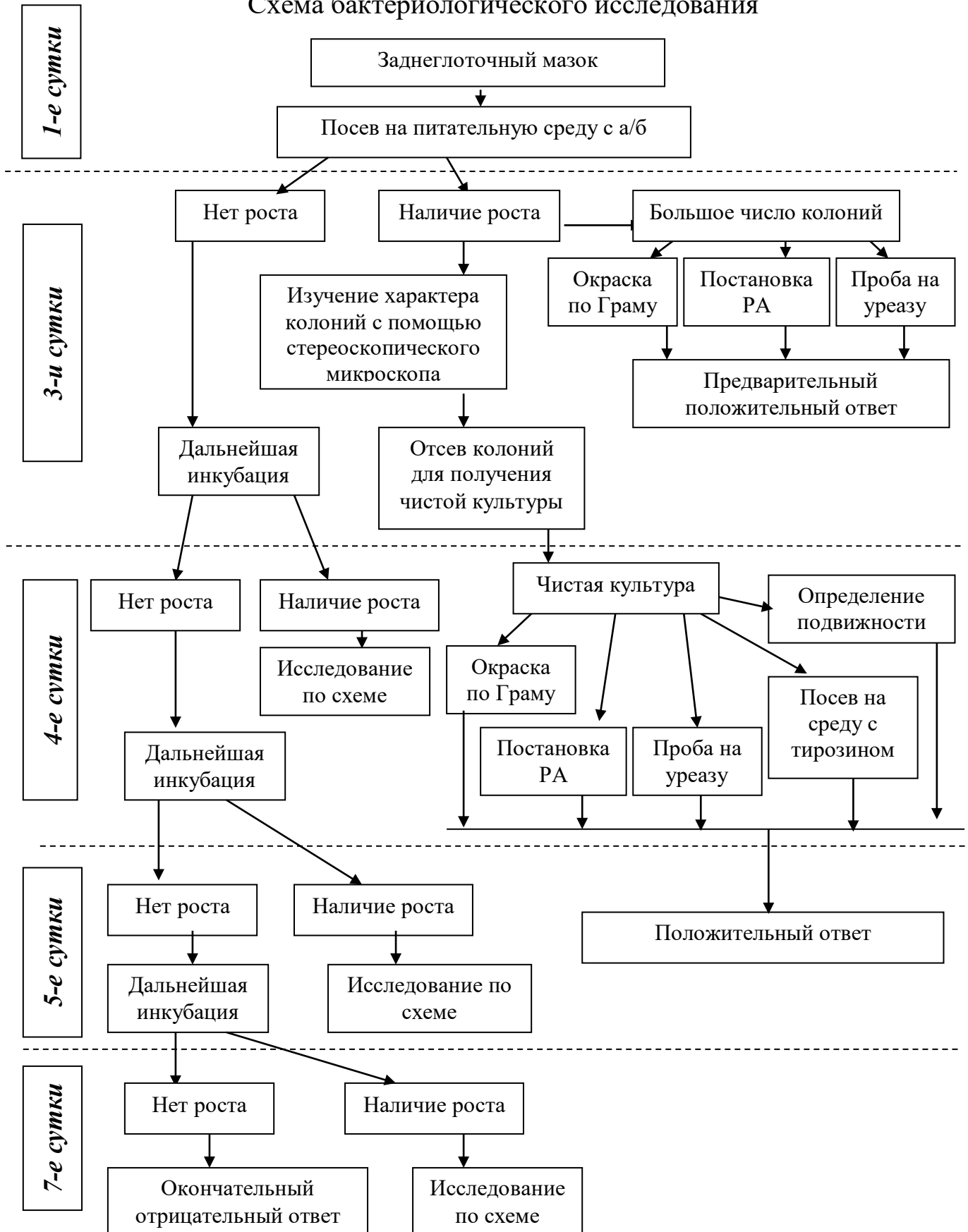
Техника забора материала из носоглотки



а, б – варианты забора носоглоточного мазка
в – забор носоглоточного аспирата

Приложение 3
к Инструкции по применению
«Лабораторные исследования при
коклюше и паракоклюше»

Схема бактериологического исследования



Приложение 4
к Инструкции по применению
«Лабораторные исследования
при коклюше и паракоклюше»

Праймеры, используемые для выявления фрагментов ДНК *B.pertussis*
и *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*

Возбудитель	Праймеры	Последовательность 5' 3'	Длина ПЦР продукта
<i>B. pertussis</i> (мишень IS481)	ISBPF1 ISBPR1	5'CATCAAGAAGCTGGGACG3' 5'TCGGTGTTGGGAGTTCTG3'	408 п.н.
<i>B. pertussis</i> (мишень специфичный для <i>B.pertussis</i> сегмент, расположенный с 28315 по 32100 нуклеотиды)	BP637F1 BP637R1	5'ААСССГАТГАСТСГАТГАТГСТ3' 5'ГТГАСГАТТАССАГАСГАТТА3'	637 п.н.
<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>B. bronchiseptica</i> (мишень <i>ptxA</i> promoter (PT))	PT-F PT-R	5'GCACCATCCCGCATACGTGTTG3' 5'GTGCAACGCATCCCGTCTTCC3'	239 п.н.
<i>B. parapertussis</i> (мишень IS1001)	ISBPAF1 ISBPAR1	5'-CCGCCTACGAGTTGGAGA3' 5'-CCGCTTGATGACCTTGATAG3'	493 п.н.

Приложение 5
к Инструкции по применению
«Лабораторные исследования
при коклюше и паракоклюше»

Схема приготовления разведений коклюшной культуры для проверки
качества КУА

№№ пробирок	Кол-во физ. р-ра (в мл)	Объем вносимой взвеси (в мл)	Количество микробов в 1 мл	
1	1,0	1,0 исходной взвеси	5.000.000.000	$(5 \cdot 10^9)$
2	4,5	0,5 из 1-й пробирки	500.000.000	$(5 \cdot 10^8)$
3	4,5	0,5 из 2-й пробирки	50.000.000	$(5 \cdot 10^7)$
4	4,5	0,5 из 3-й пробирки	5.000.000	$(5 \cdot 10^6)$
5	4,5	0,5 из 4-й пробирки	500.000	$(5 \cdot 10^5)$
6	4,5	0,5 из 5-й пробирки	50.000	$(5 \cdot 10^4)$
7	2,0	0,5 из 6-й пробирки	10.000	(10^4)
8	1,0	1,0 из 7-й пробирки	5.000	$(5 \cdot 10^3)$

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Разработана сотрудниками лаборатории иммунопрофилактики РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь (к.м.н. Колодкина В.Л., мл.н.ст. Денисевич Т.Н.)

2. Утверждена заместителем Министра здравоохранения - Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 19 марта 2010г., регистрационный № 084-0310.

3. Введена взамен инструкции, утвержденной Минздравом СССР от сентября 1983 года.