

ПРИКАЗ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ПРИДНЕСТРОВСКОЙ МОЛДАВСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

О введении в действие Методических указаний МУК МЗ ПМР 4.2.3701-24 «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами»

В соответствии с Законом Приднестровской Молдавской Республики от 3 июня 2008 года № 481-3-IV «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (САЗ 08-22), Постановлением Правительства Приднестровской Молдавской Республики от 19 августа 2024 года № 378 «Об утверждении Положения, структуры и предельной штатной численности Министерства здравоохранения Приднестровской Молдавской Республики» (САЗ 24-35) с изменениями, внесенными Постановлением Правительства Приднестровской Молдавской Республики от 28 октября 2024 года № 437 (САЗ 24-44), в целях дальнейшего совершенствования санитарно-гигиенического обеспечения населения Приднестровской Молдавской Республики, приказываю:

1. Ввести в действие на территории Приднестровской Молдавской Республики Методические указания МУК МЗ ПМР 4.2.3701-24 «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами» согласно Приложению к настоящему Приказу.

2. Направить настоящий Приказ на официальное опубликование в Министерство юстиции Приднестровской Молдавской Республики.

3. Настоящий Приказ вступает в силу со дня, следующего за днем его официального опубликования.

Министр

К. АЛБУЛ

г. Тирасполь
29 ноября 2024 г.
№ 867

Приложение к Приказу
Министерства здравоохранения
Приднестровской Молдавской Республики
от 29 ноября 2024 года № 867

Методические указания

МУК МЗ ПМР 4.2.3701-24

«Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими
бордетеллами»

Глава 1. Общие положения и область применения

1. Настоящие Методические указания (далее - МУК) определяют методические основы и алгоритмы лабораторной диагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами.

2. Настоящие МУК предназначены для учреждений Государственной санитарно-эпидемиологической службы Приднестровской Молдавской Республики, а также могут быть использованы научными и медицинскими организациями (далее - МО),

осуществляющими диагностику коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами.

Глава 2. Сущность метода

3. Коклюш - острое инфекционное заболевание с воздушно-капельным механизмом передачи, своеобразным судорожным приступообразным кашлем и циклическим затяжным течением.

Источником инфекции является человек, больной коклюшем, (дети и взрослые). Передача возбудителя осуществляется воздушно-капельным путем во время усиленного выдоха (громкий разговор, крик, плач, кашель, чихание). Наиболее интенсивная передача возбудителя происходит при кашле. Риск инфицирования особенно велик в катаральном периоде болезни, в начале периода спазматического кашля и постепенно снижается к 25 (двадцать пятому) дню. У привитых детей и взрослых коклюш может протекать атипично, без приступообразного характера кашля. Возможна передача возбудителя и бактерионосителями.

Максимальная восприимчивость к возбудителю коклюша отмечается у новорожденных и детей, не получивших профилактических прививок.

4. Для лабораторной диагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, используют бактериологический, молекулярно-генетический и серологический методы исследования:

а) бактериологическое исследование осуществляют в течение первых 2 - 3 недель от начала заболевания;

б) молекулярно-генетический метод исследования с помощью полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР) эффективен на 1 - 4 неделях от начала заболевания. Метод ПЦР наиболее эффективен для диагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, у детей раннего возраста, а также у взрослых и детей в возрасте до 14 (четырнадцати) лет со стертой и атипичной клинической картиной заболевания, а также при обследовании по эпидемиологическим показаниям;

в) серологическую диагностику коклюша методом иммуноферментного анализа (далее - ИФА) применяют начиная с 3 (третьей) недели заболевания для определения уровня специфических противококлюшных антител (IgM, IgA, IgG) к отдельным антигенам бактерий *B. pertussis*.

5. Диагноз заболеваний, обусловленных бордетеллами, устанавливают на основании выделения культуры возбудителя или дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее - ДНК) соответствующего возбудителя или выявления антител к возбудителю.

Глава 3. Характеристика бактерий рода *Bordetella*

6. Возбудители коклюша и коклюшеподобных заболеваний относятся к роду *Bordetella* (семейство *Alcaligenaceae*, порядок *Burkholderiales*, класс *Betaproteobacteria*), включающему следующие виды: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*. Помимо этих видов, открыты еще пять бордетелл: *B. petrii*, *B. ansorpii*, *B. bronchialis*, *B. flabilis*, *B. sputigena*.

Дифференциация бактерий рода *Bordetella*, являющихся возбудителями респираторных заболеваний человека и теплокровных животных, представляет определенную сложность, обусловленную слабой биохимической активностью бактерий, а также высокой гомологией их геномов.

B. pertussis вызывает острое инфекционное заболевание, характеризующееся тяжелым течением и высокой летальностью у новорожденных и детей первого года жизни, которая обусловлена развитием различного вида осложнений.

B. parapertussis вызывает у людей инфекционное заболевание, которое по клинической картине схоже с коклюшем, протекает менее интенсивно и реже вызывает развитие осложнений.

B. bronchiseptica вызывает у многих млекопитающих животных заболевания верхних дыхательных путей (бордетеллез), особенно при их скученном содержании, является ведущим инфекционным респираторным патогеном собак и кошек; встречается также бессимптомное носительство. Теплокровные животные восприимчивы к инфицированию данным микроорганизмом - болеют домашние и дикие животные. Человек инфицируется при контакте с больным животным. Заболевание у людей протекает в виде острого респираторного заболевания с приступами сухого кашля, усиливающегося перед сном.

B. holmesii выделена только от людей. *B. holmesii* вызывает коклюшеподобное заболевание, которое по клинической картине сходно с коклюшем, протекает менее интенсивно и реже вызывает развитие осложнений. У иммунокомпрометированных пациентов вызывает септицемию, артриты.

B. avium является возбудителем ринотрахеита у птиц. Описано несколько случаев выделения *B. Avium* от пожилых пациентов с отягощенным анамнезом с клинической картиной пневмонии.

B. hinzii колонизирует дыхательные пути домашней птицы. Известны случаи выделения от иммунокомпрометированных пациентов, в том числе при летальной септицемии.

B. trematum вызывает у людей раневые и ушные инфекции.

7. Устойчивость к факторам внешней среды.

Бактерии *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. Holmesii* и *B. Bronchiseptica* вне организма человека малоустойчивы к факторам внешней среды и чувствительны к ультрафиолетовым лучам, к воздействию физических и химических обеззараживающих средств, низких и высоких температур. Погибают при высыхании в течение нескольких часов, при нагревании до температуры плюс 50 °С в течение 30 (тридцати) минут, при кипячении - моментально.

8. Культурально-морфологические свойства.

Бактерии рода *Bordetella* - мелкие (0,2 - 0,5 мкм x 0,5 - 2,0 мкм) грамотрицательные короткие палочки. В мазках - одиночные или в парах. Имеют нежную капсулу. Температура культивирования плюс (36 +/- 1) °С. Бордетеллы требовательны к условиям роста. Оптимальным для них является наличие в питательной среде 130 - 150 мг% аминного азота, дрожжевого экстракта, никотиновой кислоты, аминокислот (цистина, пролина, метионина, серина, глутамина и других). Классической средой для роста бордетелл является среда Борде-Жангу (картофельно-глицериновый агар) с добавлением 15-20% дефибринированной крови. Используются синтетические и полусинтетические среды, в частности казеиново-угольный агар (далее - КУА) и Бордетелагар. Наиболее требовательны к питательным средам *B. Pertussis* и *B. holmesii*. Бактерии *B. Parapertussis* и *B. ronchiseptica*, в отличие от *B. Pertussis* и *B. holmesii*, могут расти на более простых питательных средах без добавления крови и угля.

На плотных питательных средах бордетеллы образуют колонии - круглые, выпуклые, влажные, гладкие, блестящие, с ровными краями, имеют мягкую, маслянистую консистенцию и легко снимаются петлей.

На среде Борде-Жангу с кровью - серебристого цвета, напоминающие капли ртути, или жемчужно-белые, окруженные зоной гемолиза в виде потемнения (почернения) среды.

На среде КУА - серого цвета с голубоватым, зеленоватым, жемчужным или беловатым оттенком.

На Бордетелагаре - серовато-белого, серовато-кремового или кремового цвета.

При просмотре в стереоскопическом микроскопе можно увидеть узкий луч света («хвостик»), отходящий от центра колонии. Сроки формирования колоний представлены в таблице № 1 Приложения № 1 к настоящему МУК.

9. Ферментативная активность микроорганизмов рода *Bordetella* определяется по их способности продуцировать ферменты каталазу, оксидазу, тирозиназу, уреазу, а также редуцировать нитраты в нитриты и расти на цитратном агаре Симмонса.

Бактерии *B. Pertussis* и *B. Holmesii* биохимически малоактивны. *B. Pertussis* обладает каталазной и оксидазной активностью, не продуцирует ферменты тирозиназу и уреазу, не растет на цитратном агаре Симмонса и не редуцирует нитраты в нитриты. Бактерии *B. Holmesii* продуцируют фермент тирозиназу, не обладают оксидазной активностью, не продуцируют фермент уреазу, не растут на цитратном агаре Симмонса и не редуцируют нитраты в нитриты.

Бактерии *B. Parapertussis* обладают каталазной и не обладают оксидазной активностью, продуцируют ферменты тирозиназу и уреазу, не растут на цитратном агаре Симмонса и не редуцируют нитраты в нитриты. Бактерии *B. Bronchiseptica* более биохимически активны: продуцируют фермент уреазу, обладают каталазной и оксидазной активностью, не продуцируют фермент тирозиназу, растут на цитратном агаре Симмонса и редуцируют нитраты в нитриты.

Основные биохимические свойства видов рода *Bordetella*, которые используются в практической работе при изучении выделенных культур, представлены в таблице № 2 Приложения № 1 к настоящим МУК.

10. Антигенное строение и серологическая характеристика микроорганизмов рода *Bordetella*. Факторы патогенности *B. Pertussis* подразделяют на токсины и адгезины. К токсинам относят коклюшный токсин, аденилатциклазный токсин, трахеальный цитотоксин, дермoneкротический токсин, липополисахаридный эндотоксин. К адгезинам - филаментозный гемагглютинин (далее - ФГА), агглютиногены, фимбрии, белок наружной мембраны пертактин и другие. Агглютиногены (далее - АГГ) - поверхностные белки, которые ответственны за выработку антител, агглютинирующих бактериальные клетки. У микроорганизмов рода *Bordetella* описано 16 АГГ, согласно таблице № 3 Приложения № 1 к настоящим МУК.

Бактерии рода *Bordetella* имеют общие для всего рода АГГ (родовые) и видовые специфические (только для данного вида возбудителя). Наличие 7-го общего родового АГГ обуславливает положительную реакцию агглютинации с гомологичными и гетерологичными неадсорбированными сыворотками (коклюшными и паракклюшными) и свидетельствует о наличии в исследуемом материале микроорганизмов рода *Bordetella*. Видоспецифичным фактором для *B. Pertussis* являются АГГ 1, 2, 3; для *B. Parapertussis* - АГГ 14 и для *B. Bronchiseptica* - АГГ 12. Видовую дифференциацию проводят с помощью адсорбированных моноклональных сывороток к видовым АГГ возбудителей коклюша, паракклюша и бронхисептикоза (АГГ 1, 14 и 12). В зависимости от наличия у бактерий *B. Pertussis* видоспецифических АГГ выделяют четыре серотипа: 1,0,0; 1,0,3; 1,2,0 и 1,2,3.

Серотипирование возбудителя коклюша в отечественной практике основано на агглютинации бактерий *B. Pertussis* монофакторными сыворотками в реакции агглютинации на стекле, в зарубежной практике - на агглютинации бактериальных клеток моноклональными антителами к фимбриальным антигенам в реакции агглютинации в микропланшете.

Факторы патогенности присутствуют у свежевыделенных штаммов коклюшного микроба. При хранении и культивировании на искусственных питательных средах может наблюдаться их деградация, обусловленная мутациями или нарушением экспрессии соответствующих генов. В процессе роста коклюшный микроб проходит четыре фазы. Свежевыделенный микроб (гладкая форма), обладающий максимальными вирулентными и иммуногенными характеристиками, относится к первой фазе. По мере перехода к четвертой (авирулентной) фазе постепенно утрачивается его иммуногенность, вирулентность, меняются культуральные свойства. Бактерии в разных фазовых состояниях регистрируются и в организме больных коклюшем.

11. Показания к обследованию и критерии лабораторного подтверждения диагноза.

При постановке диагноза «коклюш» учитываются:

- а) характерные клинические проявления;
- б) результаты лабораторных исследований, в том числе выделение культуры возбудителя при бактериологическом исследовании, или ДНК возбудителя при молекулярно-генетическом исследовании, или выявление специфических антител при серологическом исследовании в ИФА;
- в) данные эпидемиологического анамнеза (состояние привитости и наличие у пациента контакта с больным коклюшем).

Все случаи бактерионосительства возбудителя коклюша диагностируют на основании результатов выделения культуры возбудителя или ДНК возбудителя.

12. Классификация случаев заболевания коклюшем:

- а) «подозрительным» считается случай, при котором имеются клинические признаки коклюша;
- б) «вероятным» считается случай, при котором имеются характерные клинические признаки и выявлена эпидемиологическая связь с другим подозрительным или подтвержденным случаем;
- в) «подтвержденным» считается случай, ранее классифицированный как «подозрительный» или «вероятный», после лабораторного подтверждения (с выделением культуры возбудителя, или ДНК возбудителя, или специфических противокклюшных антител).

13. Окончательный диагноз коклюша устанавливается:

- а) клинически на основании характерных симптомов болезни;
- б) на основании характерных симптомов болезни с учетом наличия эпидемиологической связи с источником инфекции;
- в) по подтверждению предварительного диагноза лабораторными методами (выделением культуры, или ДНК возбудителя, или противокклюшных антител).

При атипичных формах болезни лабораторно подтвержденный случай коклюша необязательно должен иметь клинические проявления.

Диагноз заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, учитывая схожесть клинических проявлений с коклюшем, устанавливается на основании выделения культуры или ДНК соответствующего возбудителя.

Иммунитет к коклюшу формируется после перенесенного заболевания или после проведения иммунизации против этой инфекции. Показателем наличия иммунитета к коклюшу является присутствие в крови специфических иммуноглобулинов (антител) класса G.

14. Сроки использования различных методов диагностики в зависимости от возраста и прививочного анамнеза представлены в таблице № 4 Приложения № 1 к настоящему МУК.

Глава 4. Организационно-методическая работа

15. Все работы по взятию, транспортировке и подготовке проб биологического материала, проведение бактериологических, ПЦР- и серологических исследований, сбору, хранению и утилизации отходов осуществляют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями.

16. Взятие биологического материала проводится медицинским персоналом МО (врачами, средним медицинским персоналом) с использованием средств индивидуальной защиты (далее - СИЗ) - медицинской маски, респиратора, защитного экрана и других. Взятие биологического материала проводится в специально выделенном для этих целей помещении. В отдельных случаях допускается производить взятие материала на дому.

17. Биологический материал забирают натошак или через 2 - 3 часа после еды, до применения других видов исследования или процедур (в том числе полосканий), при хорошем освещении. В течение 6 (шести) часов перед процедурой не используют медикаменты, орошающие носоглотку или ротоглотку, и препараты для рассасывания во рту.

18. На доставляемый в лабораторию материал оформляется направление, в котором указывается:

- а) наименование МО, направившей материал на исследование, телефон, адрес электронной почты (по возможности);
- б) фамилия, имя, отчество (при наличии), возраст, адрес проживания, адрес регистрации обследуемого;
- в) дата и время взятия материала;
- г) метод лабораторной диагностики (бактериологический метод, ПЦР или ИФА по выявлению противокклюшных антител классов IgM, IgG, IgA);
- д) тип материала и метод его взятия;
- е) предполагаемый диагноз или повод к обследованию;
- ж) дата заболевания или контакта с больным;
- з) данные о вакцинации против коклюшной инфекции (вакцинирован, даты и количество полученных доз с указанием вакцины; или не вакцинирован; или нет данных);
- и) кратность обследования;
- к) фамилия, имя, отчество (при наличии), должность, подпись и контактный телефон лица, взявшего материал (разборчиво).

Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прикрепляются снаружи к контейнеру.

19. Медицинский персонал МО (врачи, средний медицинский персонал), допущенный к взятию и посеву биологического материала, проходит входящий и затем повторный инструктаж на рабочем месте не реже 1 (одного) раза в 6 (шесть) месяцев. Инструктаж по взятию биологического материала проводит врач-инфекционист с привлечением врача-бактериолога (для инструктажа методики посева при бактериологическом исследовании) и регистрацией в соответствующем журнале с указанием подписей инструктируемого и инструктирующего и даты проведения инструктажа.

20. Бактериологические исследования проводятся врачами-бактериологами и биологами, прошедшими первичную специализацию по клинической лабораторной диагностике и периодическое повышение квалификации по специальности «Бактериология» в установленном законодательством порядке.

ПЦР- и серологические исследования проводятся врачами клинической лабораторной диагностики, врачами-бактериологами, врачами-вирусологами и биологами, прошедшими первичную специализацию по клинической лабораторной диагностике и периодическое повышение квалификации в установленном порядке.

Подготовительную работу при проведении бактериологических, ПЦР- и серологических исследований (прием поступающих образцов и сопроводительных документов, регистрацию биологического материала, проведение технических манипуляций, в том числе подготовку помещений, ламинарных боксов, расходных материалов, утилизацию использованных расходных материалов и остатков использованных биологических образцов) выполняет специалист со средним медицинским образованием и соответствующей квалификацией (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант, лаборант), имеющий сертификат специалиста и прошедший периодическое повышение квалификации в установленном порядке.

21. Результаты бактериологического, ПЦР- и серологического исследований оформляются в регистрационном и рабочем журналах в бумажной форме (возможно дублирование в электронной форме) и в бланке выдачи результатов. В бланке результатов указывается следующая информация:

- а) название лаборатории и МО;
- б) информация о пациенте, достаточная для его идентификации;
- в) название биологического материала и всех исследуемых показателей;
- г) дата взятия материала для исследования;
- д) дата проведения исследования;

- е) результаты исследования;
- ж) фамилия имя, отчество (при наличии) и подпись работника, выполнившего исследование.

22. Методическую помощь по вопросам взятия, транспортировки и лабораторной диагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, осуществляют центры гигиены и эпидемиологии.

Глава 5. Требования безопасности

23. Лаборатории, в которых проводятся работы с объектами и материалами, содержащими или подозрительными на содержание патогенных биологических агентов (далее - ПБА) III - IV групп патогенности, должны иметь лицензию на данный вид деятельности и санитарно-эпидемиологическое заключение в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями.

24. При выполнении бактериологических, ПЦР- и серологических исследований необходимо соблюдать требования по электробезопасности при работе с электроустановками по инструкции по эксплуатации прибора.

25. Все виды работ с реактивами проводят только в вытяжном шкафу при работающей вентиляции, работа с биологическим материалом осуществляется в боксированном помещении, оборудованном бактерицидными лампами и боксами микробиологической безопасности II класса, в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями.

Глава 6. Условия проведения исследований

26. Бактериологические, ПЦР- и серологические исследования проводятся с использованием необходимого оборудования, расходных материалов и реагентов (согласно приложениям № 2,3,4 к настоящим МУК).

27. Приготовление питательных сред и реактивов, проведение бактериологических, ПЦР- и серологических исследований осуществляют в следующих условиях:

- а) температура воздуха плюс $(21,5 \pm 3,5) ^\circ\text{C}$;
- б) атмосферное давление 760 ± 20 мм рт. ст.;
- в) влажность воздуха не более 80%.

Глава 7. Бактериологическая диагностика: общие сведения

28. Бактериологическое исследование с диагностической целью и по эпидемиологическим показаниям проводится двукратно (2 (два) дня подряд или с интервалом в 1 (один) день) на ранних сроках заболевания (первые 2 - 3 недели болезни) до начала терапии антибактериальными препаратами, поскольку в более поздние сроки и на фоне антибиотикотерапии высеваемость возбудителя резко снижается.

Глава 8. Взятие биологического материала для бактериологического исследования

29. Исследуемым материалом является слизь из верхних дыхательных путей, осаждающаяся при кашле на задней стенке ротоглотки.

Взятие материала проводится либо заднеглоточным тампоном со слизистой задней стенки ротоглотки, либо методом «кашлевых пластинок». Заднеглоточным тампоном материал забирают как с диагностической целью, так и по эпидемиологическим показаниям. Метод «кашлевых пластинок» используют только с диагностической целью и при наличии кашля. У детей грудного возраста биологический материал со слизистой задней стенки ротоглотки забирается с помощью заднеглоточного тампона.

Для взятия материала используют тампоны, изготовленные в лаборатории и предварительно (до стерилизации) изогнутые под тупым углом ($110 - 120^\circ$). Применяют

два вида тампонов: сухой и смоченный забуференным физиологическим раствором по прописи Кузнецова Е.А. Взятие материала сухим тампоном стимулирует кашель и повышает возможность выделения возбудителя при взятии материала вторым (влажным) тампоном.

В качестве сухого тампона для взятия патологического материала со слизистой задней стенки ротоглотки допускается использование сухого одноразового универсального стерильного велюр-тампона на пластиковом аппликаторе в индивидуальной упаковке без транспортной среды или коммерческие стерильные тампоны на легко сгибающейся алюминиевой основе в индивидуальной упаковке без транспортной среды. Не используются урогенитальные тампоны.

Материал с сухого тампона засевают непосредственно на месте взятия у постели больного. При этом используют чашку Петри с питательной средой, предоставленную лабораторией. Среда должна быть предварительно обработана антибактериальным препаратом, к которому устойчивы бордетеллы, с целью подавления сопутствующей микрофлоры. Посев осуществляется с формированием четырех площадок. Далее чашку до момента отправки в лабораторию помещают в термостат при плюс (36 +/- 1) °C.

Материал на влажном тампоне доставляют в лабораторию, где производится его посев на чашку Петри с питательной средой, предварительно обработанной антибактериальным препаратом с целью подавления сопутствующей микрофлоры. До момента отправки в лабораторию материал на влажном тампоне хранится при комнатной температуре.

Методика взятия материала сухим и влажным тампонами одинакова и сводится к следующему. Медицинский работник левой рукой фиксирует с помощью шпателя корень языка, а правой вводит тампон в полость рта, продвигая его за корень языка. Тампон не должен касаться слизистой щек, зубов, языка и миндалин. Кончиком тампона и выпуклой его частью дотрагивается до задней стенки ротоглотки, проводя по ней справа налево 2 - 3 раза. Затем так же осторожно, над шпателем, извлекает тампон из полости рта. Если ребенок проявляет признаки беспокойства, то стоящий за его спиной помощник сзади фиксирует голову.

30. Взятие материала «кашлевыми пластинками» производят на 2 (две) чашки с питательной средой. Во время приступа кашля левой рукой снимают крышку чашки Петри, а правой подносят ее ко рту на расстоянии 10 - 12 см так, чтобы капельки слизи из дыхательных путей попали на поверхность питательной среды. Чашку в таком положении держат некоторое время (в течение 6 - 8 кашлевых толчков). При непродолжительном покашливании можно эту чашку поднести повторно. На питательную среду не должны попадать слюна, рвотные массы, мокрота. Затем чашку Петри с питательной средой закрывают крышкой и доставляют в лабораторию.

Глава 9. Транспортирование биологического материала

31. Тампоны и посевы с биологическим материалом с сопроводительной документацией доставляют в лабораторию не позднее чем в течение 2 - 3 часов после его взятия. Транспортирование осуществляется в сумках-термосах при температуре плюс (36 +/- 1) °C, что обеспечивает защиту материала от прямых солнечных лучей и переохлаждения.

Глава 10. Бактериологическое исследование материала

32. Бактериологический метод исследования предусматривает выделение возбудителя заболевания путем посева на плотные питательные среды с последующим накоплением чистой культуры и ее видовой идентификацией. Продолжительность исследования составляет 5 - 7 дней.

Глава 11. Порядок проведения бактериологического исследования

33. Бактериологическое исследование по продолжительности занимает до 7 (семи) дней.

34. Первый день исследования (посев биологического материала). Среды, предназначенные для посева и разлитые в чашки Петри слоем не менее 4 - 6 мм, предварительно асептически подсушивают одним из следующих способов:

а) перевернутые чашки Петри с открытыми крышками выдерживают в термостате при температуре плюс $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ до исчезновения капель влаги с поверхности агара, не пересушивая;

б) чашки Петри с полуоткрытыми крышками помещают в стерильный ламинарный бокс на 30 (тридцать) минут.

Посев биологического материала, взятого влажным тампоном, производят после его доставки в лабораторию на чашку Петри с питательной средой с антибиотиком. Добавление антибактериального препарата в питательную среду производится любым из двух способов: путем обработки ее поверхности или путем непосредственного внесения его в среду, которое производится предварительно в лаборатории. Антибиотик используется с целью подавления сопутствующей микрофлоры (согласно пункту 59 настоящих МУК). При взятии материала методом «кашлевых пластинок» предварительная обработка питательной среды или внесение в нее антибиотика не осуществляется.

Посев биологического материала с сухого тампона производят непосредственно у постели больного на месте взятия в МО и доставляют на чашке Петри с питательной средой в лабораторию.

Для получения изолированных колоний посев биологического материала как сухим, так и влажным тампонами производят одинаково одним из следующих способов:

Тщательно втирают материал тампоном сначала по периферии чашки Петри с питательной средой в виде четырех площадок (1 - 4), а затем Z-образным штрихом в центре чашки (5). В заключение растирают стерильным шпателем центральную часть посева, не касаясь площадок (рисунок 1 Приложения № 1 к настоящим МУК). Посев материала, взятого универсальным велюр-тампоном, производят путем втирания его в поверхность агара со всех сторон рабочей части тампона, вначале намечая четыре площадки (1 - 4) по периметру чашки Петри, и ею же в центре чашки наносят Z-образный штрих (5). Затем в лаборатории формируются площадки бактериологических петлей и в заключение растирают стерильным шпателем центральную часть посева, не касаясь площадок. Использование велюр-тампона является технически более простым и позволяет максимально полно оставить биологический материал на поверхности питательной среды (рисунок 1 Приложения № 1 к настоящим МУК).

По методу Голда (секторными посевами). При этом материал втирают тампоном в сектор А (1/4 часть площади чашки со средой), после этого стерильной петлей проводят 3 - 4 штриха в соседний сектор I, после прожигания петли повторяют эти же действия, перенося материал из сектора I в сектор II, а из сектора II в сектор III (рисунок 2 Приложения № 1 к настоящим МУК).

Засеянные (тампонами или методом «кашлевых пластинок») и промаркированные чашки помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре плюс $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 - 72 часов.

Чашки рекомендуется ставить в стопки не более чем по 2 (две) штуки в высоту, поскольку необходимо оставлять пространство для циркуляции воздушного потока в термостате, чтобы температура питательной среды в чашках Петри в максимально короткие сроки пришла в равновесие с температурой инкубации.

Для увлажнения воздуха в термостат помещают сосуд с водой, чтобы минимизировать потерю влажности агаровой среды в течение инкубации и, таким образом, исключить воздействие неблагоприятного фактора, оказывающего влияние на рост микроорганизмов.

35. Второй, третий или четвертый день исследования (выделение и накопление чистой культуры). Посевы начинают просматривать только с помощью микроскопа биологического стереоскопического (далее - МБС) с целью выявления и дальнейшего пересева подозрительных колоний.

Через 24 - 48 часов просматривают посевы на чашках с целью выявления бактерий *B. Bronchiseptica* и *B. paraptussis*.

Через 48 - 72 часа посевы на чашках просматривают с целью выявления *B. Pertussis* и *B. holmesii*.

Колонии основных видов микроорганизмов рода *Bordetella* при росте на плотных питательных средах - круглые, выпуклые, влажные, гладкие, блестящие, с ровными краями, серебристого, жемчужно-белого, серого цвета с голубоватым, зеленоватым или жемчужным оттенком, серовато-белого, серовато-кремового или кремового цвета; имеют мягкую, маслянистую консистенцию и легко снимаются петлей. При просмотре колоний в стереоскопическом микроскопе можно наблюдать узкий луч света («хвостик»), отходящий от ее центра (согласно пункту 8 настоящих МУК).

При наличии на среде выращивания подозрительных колоний производят выделение чистой культуры путем их пересева в чашку Петри с питательной средой без селективных добавок (то есть антибиотика), поверхность которой делят на несколько секторов; каждую колонию отсевают на отдельный сектор, тщательно втирая ее круговыми движениями в среду. Инкубируют при температуре плюс (36 +/- 1) °C в течение 24 - 48 часов.

Учитывая, что при посеве исследуемого материала на питательных средах периодически вырастают колонии атипичных бактерий *B. Pertussis* и *B. holmesii*, рекомендуется производить пересев максимального числа колоний (в среднем не менее пяти).

При отсутствии роста подозрительных колоний на среде выращивания чашки Петри вновь помещают в термостат для дальнейшей инкубации на 24 - 72 часа и просматривают повторно в соответствующие сроки.

36. Третий, четвертый или пятый день исследования (видовая идентификация). Просматривают посевы, произведенные с целью выделения чистой культуры, и проводят визуальную оценку изменения цвета питательной среды, осмотрев ее в проходящем свете.

На предметном стекле в капле физиологического раствора готовят мазки и окрашивают их по методу Грама. Определяют морфологию клеток выделенной культуры и оценивают ее чистоту, а также отмечают отсутствие спонтанной агглютинации. Основные представители рода *Bordetella* имеют вид мономорфных мелких коротких грамотрицательных палочек. При культивировании на агаре Борде-Жангу с кровью и глицерином *B. Paraptussis* могут приобретать форму удлинённых полиморфных палочек.

Серологические свойства определяют в реакции агглютинации на предметном стекле со специфическими неадсорбированными коклюшными и паракклюшными сыворотками, разведенными в соотношении 1:10, а также с адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам 1, 12 и 14. Серотип коклюшного микроба определяют агглютинацией с монорецепторными сыворотками к факторам 2 и 3.

Изучают особенности и характер роста на простых питательных средах:

- а) засевают культуру на 10%-й кровяной агар;
- б) засевают культуру на мясопептонный агар (далее - МПА);
- в) определяют подвижность путем посева уколом в столбик полужидкого питательного агара.

Изучают биохимические свойства выделенной культуры:

- а) определяют оксидазную активность путем постановки оксидазного теста. Метод основан на способности оксидазы, продуцируемой некоторыми микроорганизмами при росте на питательной среде, изменять цвет индикатора;

- б) определяют наличие фермента тирозиназы путем посева культуры на простой питательный агар с 0,1% тирозина и последующей оценкой способности к пигментообразованию;

в) определяют способность расти на цитратном агаре Симмонса;
г) определяют уреазную активность по методу Заксе или путем посева на питательный бульон с мочевиной; допускается использование готовых к применению коммерческих тестов (наборов) реагентов.

д) определяют способность редуцировать нитраты в нитриты путем посева культуры в пробирку с нитратным бульоном.

Для проведения идентификации бактерий рода *Bordetella* по культуральным, биохимическим и серологическим свойствам используют только чистые культуры.

37. Четвертый, пятый, шестой или седьмой день исследования (выдача окончательного ответа): на основании изучения характера роста и внешнего вида колоний и морфологии клеток в мазках, окрашенных по Граму, положительной реакции агглютинации с видовыми неадсорбированными и адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам 1, 12 и 14, а также результатов тестов, позволяющих оценить биохимические свойства испытуемой культуры, может быть выдан окончательный положительный ответ.

Если на шестые сутки (седьмой день исследования) на среде выращивания не обнаружены колонии, подозрительные для бактерий рода *Bordetella*, то наблюдение прекращают и выдают окончательный отрицательный ответ.

Глава 12. Схема бактериологического исследования

38. Первый день: посев исследуемого биологического материала на среды выращивания и инкубирование в термостате при плюс (36 +/- 1) °С.

Второй, третий или четвертый день: изучение особенностей и характера роста сформированных колоний на средах выращивания с использованием МБС. Пересев подозрительных колоний для выделения чистой культуры. При отсутствии роста подозрительных колоний на четвертый день исследования чашки со средой выращивания просматривают на пятый и шестой дни. Дальнейший ход исследования продолжается по схеме.

Третий, четвертый или пятый день: визуальная оценка изменения цвета питательной среды при ее просмотре в проходящем свете. Приготовление мазков и определение отсутствия спонтанной агглютинации в капле физиологического раствора на предметном стекле, окраска их по Граму, микроскопия.

Постановка реакции агглютинации на предметном стекле со специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками в разведении 1:10 и специфическими монорецепторными сыворотками к факторам 1, 12 и 14; определение серотипа коклюшного микроба путем постановки реакции агглютинации на предметном стекле со специфическими монорецепторными сыворотками к факторам 2 и 3.

Изучение особенностей и характера роста на простых питательных средах:

- а) посев культуры на 10%-й кровяной агар;
- б) посев культуры на МПА;
- в) посев культуры уколом в столбик полужидкого питательного агара.

Изучение биохимических свойств испытуемой культуры:

- а) постановка оксидазного теста;
- б) посев культуры на простой питательный агар с 0,1% тирозина;
- в) посев на цитратный агар Симмонса;
- г) постановка пробы на уреазу;
- д) посев культуры в пробирку с нитратным бульоном.

39. Четвертый, пятый, шестой или седьмой день:

а) учет результатов тестов, позволяющих оценить ростовые и биохимические свойства испытуемой культуры;

б) выдача окончательного ответа (положительного или отрицательного);

в) заключение бактериологического исследования.

40. Окончательный положительный ответ может быть выдан на 5 - 6 дни с формулировкой: «Обнаружены *B. pertussis*/*B. holmesii*/*B. parapertussis*/*B. Bronchiseptica*». Отрицательный ответ выдается на 7 (седьмой) день при отсутствии подозрительных колоний представителей рода *Bordetella* и формулируется: «*B. pertussis*/*B. holmesii*/*B. parapertussis*/*B. Bronchiseptica* не обнаружены». Результаты исследования оформляются в соответствии с пунктом 21 настоящих МУК.

Глава 13. Методики дифференциальной идентификации

41. Идентификацию бордетелл проводят путем постановки биохимических тестов.

42. Определение подвижности.

B. Bronchiseptica отличаются подвижностью, *B. pertussis*, *B. Holmesii* и *B. Parapertussis* неподвижны.

Для определения подвижности испытуемую культуру засевают бактериологической петлей методом укола в пробирку со столбиком полужидкого питательного агара (0,3 - 0,4%-го агара) высотой 5 - 6 см. Посев производят в толщу агарового столбика строго по его центру, не доходя до дна пробирки; инкубируют при температуре плюс (36 +/- 1) °C в течение 24 (двадцати четырех) часов, по истечении которых осуществляют учет результатов.

Учет результатов:

а) о наличии подвижности у исследуемой культуры свидетельствуют диффузный рост (по ходу укола и вокруг него) и равномерное помутнение (помутнение) отдельных участков столбика питательного агара;

б) культуры, не обладающие подвижностью, растут строго по ходу укола в виде стержня и не вызывают помутнения среды.

Контроль качества:

а) отрицательный контрольный образец - в отдельную пробирку засевают контрольный штамм *B. Parapertussis* B-7821;

б) положительный контрольный образец - в отдельную пробирку засевают контрольный штамм *B. Bronchiseptica* B-7822.

43. Определение тирозиназной активности.

B. parapertussis и *B. holmesii*, в отличие от *B. Pertussis* и *B. bronchiseptica*, продуцируют в процессе роста фермент тирозиназу, который катализирует окисление содержащегося в среде тирозина, в результате чего происходит образование пигментов, что вызывает потемнение среды.

Для определения пигментообразования исследуемую культуру засевают бактериологической петлей в пробирку на скошенную поверхность простого питательного агара с 0,1% тирозина с высотой агарового столбика 2 - 2,5 см, после чего посев помещают в термостат. Результат учитывают через 24 (двадцать четыре) часа инкубации при температуре плюс (36 +/- 1) °C.

Учет результатов:

а) фермент тирозиназа катализирует окисление содержащегося в среде тирозина, вследствие чего происходит образование пигментов, которые окрашивают среду в зоне роста культуры в коричневый цвет;

а) при отсутствии у исследуемой культуры этого фермента окрашивания среды не происходит. Бактерии вида *B. Pertussis* на простом питательном агаре с 0,1% тирозина не растут, вследствие чего цвет его не меняется.

Контроль качества:

а) отрицательный контрольный образец (контроль реактива) - инкубируют пробирку со стерильной средой без посева;

б) положительный контрольный образец - в отдельную пробирку засевают контрольный штамм *B. Parapertussis* B-7821.

44. Определение способности расти на цитратном агаре Симмонса.

B. bronchiseptica способен утилизировать цитрат в качестве источника углерода и расти на цитратном агаре Симмонса; *B. pertussis*, *B. Holmesii* и *B. Parapertussis* подобными свойствами не обладают.

Испытуемую культуру засевают бактериологической петлей в пробирку на скошенную поверхность цитратного агара Симмонса. Посев инкубируют при температуре плюс (36 $\pm$ 1) °C в течение 24 (двадцати четырех) часов, по истечении которых осуществляют учет результатов.

Допускается применение коммерческих питательных сред, аналогичных цитратному агару Симмонса. Исследование с использованием коммерческих питательных сред осуществляется строго в соответствии с инструкцией производителя.

Учет результатов:

а) цитратассимилирующие микроорганизмы в ходе роста и размножения на цитратном агаре продуцируют продукты жизнедеятельности, которые способствуют сдвигу pH среды в щелочную сторону, в результате чего цвет индикатора меняется; визуально это проявляется в изменении цвета скошенной части среды с зеленого на интенсивно-синий;

б) после посева и инкубации микроорганизмов, не способных расти на цитратном агаре Симмонса, цвет среды не меняется.

Контроль качества:

а) отрицательный контрольный образец (контроль реактива) - инкубируют пробирку со стерильной средой без посева;

б) положительный контрольный образец - в отдельную пробирку засевают контрольный штамм *B. Bronchiseptica* B-7822.

45. Определение уреазной активности.

B. parapertussis и *B. bronchiseptica*, в отличие от *B. Pertussis* и *B. holmesii*, обладают способностью продуцировать в процессе роста фермент уреазу и, как следствие, расщеплять мочевины до диоксида углерода и аммиака.

Уреазную активность бактерий рода *Bordetella* определяют одним из следующих способов:

а) по методу Заксе. *Extempore* смешивают 1 (одну) часть реактива А и 19 (девятнадцать) частей реактива В. Полученную смесь разливают по 0,1 - 0,2 мл в стерильные пробирки и вносят 1 (одну) петлю испытуемой культуры. Затем пробирки помещают в термостат и инкубируют при температуре плюс (36 $\pm$ 1) °C в течение 30 (тридцати) минут, по окончании которых производят учет результатов. При отсутствии изменения цвета реактива пробирки обратно помещают в термостат и результат учитывают на следующий день;

б) путем посева на питательный бульон (с содержанием аминного азота 140 - 160 мг) с мочевиной. Испытуемую культуру засевают в бульон с мочевиной, разлитый в стерильные пробирки по 2 - 3 мл, после чего их помещают в термостат. Результат учитывают через 24 (двадцать четыре) часа инкубации при температуре плюс (36 $\pm$ 1) °C;

в) путем посева на железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной. Среду разливают по 7 мл в стерильные пробирки, скашивают, оставляя столбик высотой 2,5 - 3,0 см. Одну бактериологическую петлю испытуемой культуры засевают в пробирки со средой, нанося материал сначала штрихом на скошенную поверхность, а затем уколом в столбик среды, не касаясь дна пробирки;

г) применение коммерческих питательных сред (тестов, наборов реагентов). Исследование по определению уреазной активности с использованием коммерческих сред (тестов, наборов реагентов) осуществляется в соответствии с инструкцией производителя.

Учет результатов:

а) фермент уреазы расщепляет мочевины до диоксида углерода и аммиака, вследствие чего происходит сдвиг pH среды в щелочную сторону и изменение цвета индикатора; визуально это проявляется в изменении цвета среды на малиновый. При использовании

железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной учитывают изменение цвета столбика среды и скошенной части с красного на малиновый;

б) при отсутствии у испытуемой культуры этого фермента окрашивания среды не происходит.

Контроль качества:

а) отрицательный контрольный образец (контроль реактива) - инкубируют пробирку со стерильной средой без посева;

б) положительный контрольный образец - в отдельную пробирку засевают контрольный штамм *B. Bronchiseptica* B-7822.

46. Определение нитратредуктазной активности.

B. bronchiseptica способны восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) до солей азотистой кислоты (нитриты) в отличие от *B. pertussis*, *B. Holmesii* и *B. parapertussis*, у которых фермент нитратредуктаза отсутствует.

Нитратредуктазную активность бактерий рода *Bordetella* определяют одним из следующих способов:

а) посев в пробирку с нитратным бульоном. Исследуемую культуру засевают в нитратный бульон, разлитый в стерильные пробирки по 2 - 3 мл, помещают в термостат и инкубируют при температуре плюс (36 +/- 1) °C в течение 24 (двадцати четырех) часов; затем добавляют 2 - 3 капли реактива на нитриты (реактив Грисса или реактив Касаткина) и учитывают результат;

б) применение коммерческих питательных сред (тестов, наборов реагентов). Исследование по определению нитратредуктазной активности с использованием коммерческих питательных сред (тестов, наборов реагентов) осуществляется строго в соответствии с инструкцией производителя.

Учет результатов:

а) при восстановлении нитрата до нитрита, катализируемом ферментом нитратредуктазой, после добавления реактива Грисса (Касаткина) происходит окрашивание среды в красный цвет, и реакция считается положительной;

б) если после добавления реактива Грисса (Касаткина) изменения окраски среды не происходит в течение 2 (двух) минут, то реакция считается отрицательной.

Контроль качества:

а) отрицательный контрольный образец (контроль реактива) - инкубируют пробирку со стерильной средой без посева;

б) положительный контрольный образец - в отдельную пробирку засевают контрольный штамм *B. Bronchiseptica* B-7822.

47. Определение оксидазной активности.

Бактерии вида *B. Pertussis* и *B. bronchiseptica*, в отличие от *B. Parapertussis* и *B. holmesii*, продуцируют фермент цитохромоксидазу, который катализирует перенос электронов от донаторов водорода (например, НАД-Н) к акцепторам (обычно O₂).

Оксидазную активность бактерий рода *Bordetella* определяют одним из следующих способов:

а) прямой способ на чашках. Наносят 1 (одну) каплю реагента непосредственно на изучаемую колонию и наблюдают появление темно-фиолетового окрашивания;

б) непрямой способ на фильтровальной бумаге. Полоску (диск) фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают 2 - 3 каплями реактива. Стерильной одноразовой петлей или платиновой микробиологической петлей берут исследуемую колонию и наносят ее штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу. При постановке оксидазного теста использовать петли из нержавеющей стали или нихрома не допускается, так как может наблюдаться ложноположительная реакция за счет образования продуктов окисления при ее обжиге в пламени для стерилизации;

в) применение коммерческих тестов (наборов) реагентов. Исследование по определению оксидазной активности бактерий рода *Bordetella* с использованием

коммерческих тестов (наборов) реагентов осуществляется строго в соответствии с инструкцией производителя.

Учет результатов:

а) в оксидазном тесте в качестве искусственного акцептора электронов используется бесцветный краситель, из которого в ходе окислительно-восстановительных реакций с участием микробной оксидазы образуется вещество, окрашивающееся в определенный цвет. Реакция считается положительной, если в течение 60 (шестидесяти) секунд появляется фиолетово-коричневое, синее или темно-фиолетовое окрашивание штриха, нанесенного на фильтровальную бумагу, или окрашивание изучаемой колонии. Микроорганизмы с положительной реакцией считаются оксидазо-положительными;

б) при отрицательной реакции цвет в месте нанесения штриха на фильтровальную бумагу или цвет изучаемой колонии не меняется либо окрашивание появляется через 60 (шестьдесят) и более секунд.

Контроль качества:

а) отрицательный контрольный образец ставят с контрольным штаммом *E. Coli* ATCC 25922;

б) положительный контрольный образец ставят с контрольным штаммом *P. Aeruginosa* ATCC 27853.

48. Определение способности роста на простых питательных средах.

Микроорганизмы рода *Bordetella* требовательны к условиям роста, в особенности *B. pertussis*, которые культивируются исключительно на специальных питательных средах. *B. Parapertussis* и *B. Bronchiseptica* способны расти на 10%-м кровяном агаре и МПА, *B. Holmesii* способны расти на 10%-м кровяном агаре, что является одним из дифференцирующих признаков, используемых в практической работе при изучении выделенных культур.

С целью определения способности роста на простых питательных средах испытуемую культуру:

а) засевают на отдельный сектор в чашку Петри с 10%-м кровяным агаром. Инкубируют при температуре плюс (36 +/- 1) °C в течение 24 (двадцати четырех) часов, по истечении которых учитывают результат;

б) засевают в пробирку на скошенную поверхность МПА с высотой агарового столбика 2 - 2,5 см. Результат учитывают через 24 (двадцать четыре) часа инкубации при температуре плюс (36 +/- 1) °C.

Учет результатов:

а) бактерии вида *B. Pertussis* растут на 10%-м кровяном агаре и МПА;

б) бактерии видов *B. Parapertussis* и *B. Bronchiseptica* растут на 10% кровяном агаре и МПА, бактерии *B. Holmesii* растут на 10% кровяном агаре.

49. Окраска по Граму.

Окрашивание бактерий рода *Bordetella* проводят одним из следующих способов:

а) приготовление растворов красителей в лабораторных условиях;

б) применение коммерческих наборов реагентов.

Окрашивание бактерий рода *Bordetella* с использованием коммерческих наборов реагентов осуществляется строго в соответствии с инструкцией производителя.

Методика окраски по Граму: на фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генцианового фиолетового или кристаллического фиолетового на 1/2 - 1 минуты. Сливают краситель и, не смывая, наливают раствор Люголя на 1 (одну) минуту. Сливают раствор Люголя и прополаскивают препарат в 96%-м спирте в течение 1/2 - 1 минуты, пока не перестанет отходить краситель. Промывают водой. Дополнительно окрашивают разведенным фуксином в течение 1/2 - 1 минуты. Краситель сливают, препарат промывают и высушивают.

50. Серотипирование (сероидентификация) бактерий рода *Bordetella* проводится с применением коммерческих наборов реагентов. Серотипирование (сероидентификация)

бактерий рода *Bordetella* использованием коммерческих наборов реагентов осуществляется строго в соответствии с инструкцией производителя.

Постановка реакции агглютинации на предметном стекле со специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками и специфическими монорецепторными сыворотками к факторам 1, 12 и 14; определение серотипа коклюшного микроба путем постановки реакции агглютинации на предметном стекле со специфическими монорецепторными сыворотками к факторам 2 (два) и 3 (три).

51. Для взятия материала применяют два вида заднеглоточных тампонов: сухой и смоченный забуференным физиологическим раствором по прописи Кузнецова Е.А. (согласно пункту 54 настоящих МУК).

52. Сухие тампоны используются в следующих вариантах:

а) на один конец металлической легко сгибающейся проволоки плотно наматывают слой гигроскопической ваты. Длина намотки должна быть равной 3 - 4 см (во избежание аспирации ваты). Затем конец проволоки с намоткой ваты изгибают под тупым углом 110 - 120°. Изготовленные тампоны помещают в пакеты для стерилизации по 3 - 5 штук и стерилизуют в автоклаве при плюс (112 +/- 1) °С в течение 30 (тридцати) минут или в сушильном шкафу при температуре плюс (180 +/- 1) °С в течение 1 (одного) часа или плюс (160 +/- 1) °С в течение 150 (ста пятидесяти) минут. Сухие тампоны в стеклянных пробирках, приготовленные в лабораторных условиях, хранят не более 10 (десяти) дней при комнатной температуре;

б) используются коммерческие сухие одноразовые стерильные универсальные велюр-тампоны на пластиковом аппликаторе в индивидуальной упаковке без транспортной среды;

в) используются коммерческие стерильные тампоны на легко сгибающейся алюминиевой основе в индивидуальной пластиковой пробирке. Непосредственно перед взятием материала при извлечении из пробирки тампон необходимо изогнуть под углом 110 - 120°.

Сухим тампоном проводится посев материала на чашку Петри с питательной средой в МО на месте взятия материала у постели больного.

53. Увлажненные тампоны готовят из легко сгибающейся нержавеющей проволоки (лучше алюминиевой). Намотку ваты, сгибание и стерилизацию проводят так же, как указано для сухих тампонов, приготовленных в лабораторных условиях. Стерильные согнутые тампоны перед употреблением смачивают в забуференной смеси по прописи Кузнецова Е.А. (согласно пункту 54 настоящих МУК) путем двукратного погружения в пробирку с жидкостью. После смачивания тампона его помещают в стеклянную пробирку, а затем используют для взятия материала. Влажные тампоны в стеклянных пробирках хранят 3 (три) дня при температуре плюс (2 - 8) °С.

Влажным тампоном проводится посев материала на чашку с питательной средой в лаборатории.

54. Раствор для смачивания тампонов (по прописи Кузнецова Е.А.) в конической колбе смешивают 90 - 95 мл предварительно приготовленного раствора Na₂HPO₄ (11,876 г на 1 л дистиллированной воды) и 5 - 10 мл раствора KH₂PO₄ (9,078 г на 1 л дистиллированной воды). К этой смеси добавляют 0,5 г агар-агара, стерилизуют 20 (двадцать) минут при 1 атм. Затем в горячую смесь добавляют 0,2 г активированного угля (навеску угля стерилизуют отдельно). Смесь готовят с расчетом на несколько применений и хранят при температуре плюс (2 - 8) °С до 2 (двух) месяцев.

55. Основными средами для выделения бордетелл являются питательная среда для культивирования и выделения коклюшного микроба сухая Бордетелагар, КУА, картофельно-глицериновый агар (среда Борде-Жангу).

56. Среда для первичного посева биологического материала:

а) бордетеллы являются высокотребовательными к условиям культивирования;

б) Бордетелагар: компоненты, входящие в состав Бордетелагара, представлены в таблице № 1 Приложения № 5 к настоящим МУК.

57. Приготовление Бордетелагара.

Препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 (две) минуты до полного расплавления агара, стерилизуют в автоклаве при температуре плюс $(112 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 (тридцати) минут, охлаждают до температуры плюс $(45 - 55)^\circ\text{C}$, разливают в стерильные чашки Петри слоем 5 - 6 мм, закрывают крышками и ставят для застывания при температуре плюс $(18 - 25)^\circ\text{C}$.

Готовая к применению питательная среда, разлитая в чашки Петри, непрозрачная, черного цвета; допускается наличие темных вкраплений.

Сроки и условия хранения. Готовую среду можно использовать в течение 7 - 10 дней при условии ее хранения при температуре плюс $(2 - 8)^\circ\text{C}$.

58. Компоненты, входящие в состав КУА, представлены в таблице № 2 Приложения № 5 к настоящему МУК.

Приготовление КУА: все компоненты питательной среды суспендируют в 1 л воды дистиллированной, кипятят при постоянном помешивании для полного растворения агара, стерилизуют автоклавированием при плюс $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 (пятнадцати) минут, охлаждают до плюс $(45 - 50)^\circ\text{C}$. Разливают асептично в чашки Петри слоем 4 - 6 мм.

Полужидкий КУА с добавлением крови для хранения культур готовят по аналогичной прописи, за исключением агара, который используют в концентрации 1 г/л. Все компоненты питательной среды суспендируют в 1 л воды дистиллированной, кипятят при постоянном помешивании до полного растворения агара, стерилизуют автоклавированием при плюс $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 (пятнадцати) минут, охлаждают до плюс $(45 - 50)^\circ\text{C}$, в асептических условиях добавляют 10% дефибринированной бараньей крови или крови крупного рогатого скота, перемешивают и разливают по 10 мл в стерильные пробирки.

Готовая к применению питательная среда, разлитая в чашки Петри, непрозрачная, черного цвета и содержит нерастворимые в воде черные частицы угля.

Сроки и условия хранения. Готовую среду можно использовать в течение 7 - 10 дней при условии ее хранения при температуре плюс $(2 - 8)^\circ\text{C}$.

59. Картофельно-глицериновый агар (среда Борде-Жангу).

Приготовление картофельно-глицеринового агара (среда Борде-Жангу).

500 г мелко нарезанного очищенного картофеля заливают 1 л дистиллированной воды, варят до полуготовности, добавляют 40 мл глицерина и варят до полной готовности. Отстоявшуюся жидкость фильтруют через 6 (шесть) слоев марли и доводят дистиллированной водой до 1 л. Добавляют 7,5 г натрия хлористого и 40 г агара, нагревают при перемешивании и кипятят до полного растворения агара. Основу среды стерилизуют автоклавированием при температуре плюс 121°C в течение 15 - 20 минут.

Перед употреблением в основу среды, охлажденную до плюс $(45 - 50)^\circ\text{C}$, в асептических условиях добавляют 15 - 20% стерильной дефибринированной крови (бараньей или крупного рогатого скота). Тщательно перемешивают, не допуская образования пузырьков воздуха в среде, и разливают в чашки Петри слоем 4 - 6 мм.

Готовая к применению питательная среда, разлитая в чашки Петри, непрозрачная, вишнево-красного или вишневого цвета.

Сроки и условия хранения. Готовую среду можно использовать в течение 7 - 10 дней при условии ее хранения при температуре плюс $(2 - 8)^\circ\text{C}$.

60. Добавки для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Для подавления посторонней микрофлоры при посеве исследуемого материала используют пенициллин или бициллин. Их применяют как при обработке поверхности питательной среды, разлитой в чашки Петри, так и при внесении в среду. Можно использовать цефалексин, применяемый в мировой практике.

61. Возможны два способа применения антибиотика:

- а) нанесение антибиотика на поверхность питательной среды;
- б) внесение антибиотика в питательную среду.

Для обработки поверхности среды используют антибактериальный препарат из расчета 7,5 МЕ, нанося его на поверхность среды шпателем.

Пенициллин или бициллин разводят непосредственно перед взятием материала. Для этого во флакон с антибиотиком добавляют стерильный физиологический раствор для получения основного разведения. При содержании во флаконе 500 000 МЕ в него добавляют 1 мл физиологического раствора, а при содержании 1 млн МЕ - 2 мл. Полученное основное разведение антибактериального препарата во флаконе можно хранить в холодильнике при плюс 4 °С не более 1 (одной) недели. Для получения необходимых для работы концентраций антибиотика 0,1 мл (50 000 МЕ) основного разведения из флакона растворяют в 9,9 мл стерильного физиологического раствора; 1 мл такого раствора содержит 5000 МЕ на 1 мл. Далее делают разведения до получения 75 МЕ в 1 мл физиологического раствора.

Схема разведения пенициллина или бициллина:

а) 1 (первая) пробирка - физиологический раствор 9,9 мл + 0,1 мл основного разведения антибиотика = в 1 мл 5000 МЕ;

б) 2 (вторая) пробирка - физиологический раствор 8,5 мл + 1,5 мл раствора из 1-й пробирки = в 1 мл 750 МЕ;

в) 3 (третья) пробирка - физиологический раствор 4,5 мл + 0,5 мл раствора из 2-й пробирки = в 1 мл 75 МЕ.

Из 3 (третьей) пробирки наносят 0,1 мл (7,5 МЕ) на поверхность питательной среды в каждой чашке (диаметр чашки 90 мм), тщательно втирая шпателем.

Пенициллин или бициллин вносят в среду, растопленную и остуженную до температуры плюс (50 +/- 1) °С, из расчета 30 МЕ на 100 мл среды. Для этого используют раствор из 3 (третьей) пробирки. 4 мл (300 МЕ) антибиотика добавляют на 1 л среды (из расчета 30 МЕ на 100 мл среды).

Сроки и условия хранения: рабочее разведение антибиотика (в последней пробирке) используют только в день приготовления.

62. Цефалексин используется в концентрации 40 мг/л среды. Он производится как селективная добавка для бордетелл.

Согласно инструкции производителя, содержимое одного флакона (20 мг цефалексина) асептически растворяется стерильной дистиллированной водой и добавляется к 500 мл стерильной питательной среды, растопленной и остуженной до температуры плюс (50 +/- 1) °С.

Среды и реактивы для определения биохимических свойств

63. Среда для определения подвижности.

Подвижность бордетелл определяют в полужидком питательном агаре (0,3 - 0,4) %. Состав среды для определения подвижности микроорганизмов рода *Bordetella* представлен в таблице № 3 Приложения № 5 к настоящим МУК.

Приготовление полужидкого агара. Гидролизат Хоттингера разводят водой до содержания в среде 1,2 - 1,4% аминного азота, добавляют хлорид натрия, устанавливают рН 7,2 - 7,4, добавляют агар и полностью расплавляют его, подогревая среду при постоянном помешивании. Затем фильтруют в горячем состоянии через тканевый фильтр, визуально проверяют прозрачность и в случае необходимости осветляют с помощью яичного белка или путем отстаивания в узких сосудах. Среду разливают по 10 мл в пробирки и автоклавируют при плюс (121 +/- 1) °С 30 (тридцать) минут. Охлаждают в вертикальном положении.

Сроки и условия хранения: при температуре плюс (2 - 8) °С в защищенном от света месте не более 1 (одного) месяца.

64. Среда для определения тирозиназной активности (питательный агар с тирозином). Для определения тирозиназной активности используют питательный агар с добавлением тирозина.

Приготовление среды 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 20 - 30 минут при 0,5 атм. При охлаждении среду в пробирках скашивают, оставляя столбик высотой 2 - 2,5 см.

Сроки и условия хранения: при температуре плюс (2 - 8) °С в защищенном от света месте 5 (пять) дней.

65. Среда и реактивы для определения уреазной активности. Определение уреазной активности можно осуществлять следующими способами:

а) приготовление реактивов для определения уреазной активности по методу Заксе.

Готовят 2 (два) реактива - А и В (согласно таблице № 4 Приложения № 5 к настоящим МУК). Непосредственно перед применением смешивают 1 (одну) часть реактива А и 19 (девятнадцать) частей реактива В. Полученную смесь разливают по 0,1 - 0,2 мл в стерильные пробирки.

Сроки и условия хранения: реактивы А и В хранят при температуре плюс (2 - 8) °С не более 1 (одного) месяца;

б) приготовление бульона с мочевиной для определения уреазной активности.

К 100 мл стерильного питательного бульона (мясо-пептонного бульона (далее - МПБ), бульона Хоттингера или ГРМ-бульона) (рН 7,0) добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл 1,6%-го спиртового раствора индикатора крезолового красного (крезолрот). Готовый бульон с мочевиной разливают над пламенем горелки по 2 - 3 мл в стерильные пробирки и стерилизуют текучим паром при (110 +/- 1) °С в течение 10 (десяти) минут или на водяной бане в течение 15 (пятнадцати) минут.

Сроки и условия хранения: при температуре плюс (2 - 8) °С не более 14 (четырнадцати) дней;

в) приготовление железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной для определения уреазной активности.

Состав железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной представлен в таблице № 5 Приложения № 5 к настоящим МУК. Готовая среда имеет красный цвет.

Сроки и условия хранения: готовую среду можно использовать в течение 3 (трех) суток после ее приготовления при условии хранения в темном месте при температуре плюс (18 - 25) °С или в течение 14 (четырнадцать) суток при температуре хранения плюс (2 - 8) °С.

66. Цитратный агар Симмонса.

Состав цитратного агара Симмонса представлен в таблице № 6 Приложения № 5 к настоящим МУК.

Приготовление цитратного агара Симмонса. Растворить компоненты в 1 л воды дистиллированной, автоклавировать 15 (пятнадцать) минут при плюс (121 +/- 1) °С (рН 6,6 +/- 0,2 при плюс (25 +/- 1) °С). При охлаждении среду асептически разливают по пробиркам и скашивают, оставляя столбик высотой 2,0 - 2,5 см. Готовая питательная среда прозрачная, зеленого цвета.

Сроки и условия хранения коммерческой среды определяются производителем и прописываются в инструкции. Если данная информация отсутствует, то готовую питательную среду используют в течение 10 (десяти) дней при условии ее хранения при температуре плюс (2 - 8) °С.

67. Среда и реактивы для определения нитратредуктазной активности (приготовление нитратного бульона). К 100 мл стерильного питательного бульона (ГРМ-бульона, МПБ или бульона Хоттингера) (рН 7,3 - 7,5), свободному от нитритов (проверить реактивом Грисса (Касаткина)), прибавляют 0,1 г свободного от нитритов нитрата калия. Проверяют еще раз на содержание нитритов и разливают по 2 - 3 мл в стерильные, химические чистые, сухие пробирки. Среда стерилизуют 15 (пятнадцать) минут при плюс (121 +/- 1) °С.

Сроки и условия хранения нитратного бульона: при температуре плюс (2 - 8) °С в защищенном от света месте не более 14 (четырнадцати) дней.

68. Реактив Грисса (приготовление реактива Грисса):

а) раствор № 1: 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 30 мл ледяной уксусной кислоты, прибавляют 100 мл дистиллированной воды, фильтруют.

Условия и сроки хранения: раствор годен в течение 1 (одного) месяца при плюс (2 - 8) °С;

б) раствор № 2: 0,1 г 1-нафтамина растворяют в 100 мл кипящей воды, охлаждают, прибавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты, фильтруют.

Условия и сроки хранения: растворы годны в течение 7 (семь) суток при плюс (2 - 8) °С. Растворы № 1 и № 2 хранят в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

Перед использованием растворы № 1 и № 2 смешивают в равных объемах.

Допускается использование коммерческого сухого реактива Грисса. В этом случае необходимо приготовить 7,5 - 10%-й водный раствор реактива Грисса, используя теплую (не выше плюс (50 +/- 1) °С воду дистиллированную).

Сроки и условия хранения: готовый реактив Грисса может храниться до 7 (семи) дней при плюс (2 - 8) °С. Раствор серого или розового цвета нельзя использовать.

69. Реактив Касаткина (приготовление реактива Касаткина):

а) раствор № 1: 0,1% раствор риванола в воде дистиллированной;

б) раствор № 2: 12% раствор соляной кислоты.

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов № 1 и № 2.

Сроки и условия хранения: растворы № 1 и № 2 хранят при плюс (4 +/- 1) °С в течение 2 (двух) месяцев. Реактив Касаткина годен к применению в течение 15 (пятнадцати) минут.

70. Реактивы для оксидазного теста.

Проведение оксидазного теста возможно с помощью разных вариантов реактивов, представленных ниже:

а) вариант 1 (первый): 1%-й водный раствор тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорида. Раствор готовят непосредственно перед определением;

б) вариант 2 (второй): приготовление растворов № 1 и № 2:

1) раствор № 1: 1%-й спиртовой раствор α-нафтол;

2) раствор № 2: 1%-й водный раствор N,N-диметил-пара-фенилендиамина солянокислого или другого фенилендиаминового соединения.

Перед употреблением к 3 (трем) частям раствора № 1 добавляют 7 (семь) частей раствора № 2.

30 - 40 мг α-нафтол растворяют в 2,5 см³ спирта этилового, прибавляют 7,5 мл воды дистиллированной и растворяют 40 - 60 мг диметил-пара-фенилендиамина.

Сроки и условия хранения: растворы хранят в темных флаконах с притертыми пробками; раствор № 1 - до 1 (одного) месяца, раствор № 2 - до 1 (одной) недели;

в) вариант 3 (третий): приготовление полосок (дисков) фильтровальной бумаги для оксидазного теста: 30 мг α-нафтол растворить в 2,5 мл 96%-го спирта этилового, добавить 7,5 мл воды дистиллированной и затем 50 мг диэтиланилинсульфата; смочить подготовленные полоски (диски) фильтровальной бумаги, высушить.

Сроки и условия хранения: в темноте в черной бумаге 6 (шесть) месяцев;

г) вариант 4 (четвертый): возможно применение коммерческих дисков или полосок для обнаружения цитохромоксидазы.

71. Красители.

В лабораторных условиях для выполнения окраски по методу Грама готовят следующие растворы:

а) карболовый раствор генцианового фиолетового или кристаллического фиолетового:

1) 1 г красителя, 10 мл 96%-го спирта этилового, 2 г кристаллической карболовой кислоты, 100 мл воды дистиллированной. В ступке растирают краситель с карболовой кислотой до консистенции кашицы, прибавляют небольшими порциями спирт этиловый и окончательно разводят водой, сливают в бутылку, оставляют на сутки, затем фильтруют;

2) 10 мл насыщенного 4,8%-го спиртового раствора красителя, 100 мл 2% карболовой воды.

Сроки и условия хранения: в темном прохладном месте при температуре плюс (2 - 5) °С не более 2 (двух) месяцев;

б) раствор Люголя (в модификации Грама).

Приготовление раствора Люголя (в модификации Грама): 2 г йодида калия, 10 мл воды дистиллированной, 1 г йода кристаллического; полученную смесь хорошо укупоривают, оставляют на сутки, после чего добавляют 300 мл воды дистиллированной.

Сроки и условия хранения: в сухом защищенном от света месте при температуре плюс (8 - 15) °С не более 30 (тридцати) дней. Раствор Люголя (в модификации Грама) необходимо защищать от света, поэтому его надо хранить в склянках из темного стекла;

в) карболовый раствор фуксина Циля.

Приготовление карболового раствора фуксина Циля - 1 г основного фуксина, 10 мл 96%-го спирта этилового, 5 г кристаллической карболовой кислоты, 100 мл воды дистиллированной; в ступке растирают краситель с карболовой кислотой до консистенции кашицы, прибавляют небольшими порциями 96%-й спирт этиловый и окончательно разводят водой; сливают в бутыл, оставляют на сутки, затем фильтруют.

Сроки и условия хранения: в сухом защищенном от света месте при температуре плюс (10 - 35) °С не более 1 (одного) года.

72. Перечень контрольных штаммов.

Для проведения внутрилабораторного контроля качества питательных сред (реактивов и реагентов, наборов реагентов) и постановки биохимических тестов используются следующие контрольные штаммы:

а) *B. pertussis*143 (B-4635), *B. pertussis*688 (B-4628) или *B. pertussis*796 (B-4632);

б) *B. Parapertussis* B-7821;

в) *B. bronchiseptica* B-7822;

г) *P. aeruginosa* ATCC 27853 (NCTC 12903);

д) *E. Coli* ATCC 25922.

Контрольные штаммы *B. pertussis*, *B. Parapertussis* и *B. Bronchiseptica* получают из государственных коллекций патогенных микроорганизмов. Другие штаммы допускается получать из любых коллекций патогенных микроорганизмов.

Используемые контрольные штаммы должны обладать типичными свойствами и соответствовать паспортным данным.

73. Хранение контрольных штаммов в лабораторных условиях.

Контрольные штаммы бордетелл хранят при температуре плюс (2 - 8) °С в лиофилизированном состоянии или на среде хранения, в качестве которой используют полужидкий КУА с добавлением крови, приготовленный согласно пункту 58 настоящих МУК. Пересевы культур со среды хранения на среду выращивания и вновь на среду хранения проводят через каждые 3 (три) месяца, но не более 4 (четырёх) раз.

Контрольные штаммы других микроорганизмов хранят в соответствии с инструкцией коллекции патогенных микроорганизмов или методическими документами.

Допускается хранение культур при температуре не выше минус 70 °С в криопробирках в защитной среде следующего состава: глицерин - 100 мл, лактоза - 50 г, вода дистиллированная - до 1 л. Криопробирки с запасом эталонной культуры устанавливают в криобокс и закладывают на хранение при температуре минус 70 °С. Альтернативным вариантом является хранение в жидком азоте при наличии соответствующего оборудования.

Закладку запасов эталонной культуры на длительное хранение осуществляют единожды на весь период ее использования. Запасы эталонной культуры восполнению не подлежат.

74. Подготовка контрольных штаммов бордетелл для оценки качества питательных сред и реагентов:

а) I (первый) пассаж: перед проведением контроля в ампулы с лиофилизированными культурами контрольных штаммов вносят по 0,5 мл стерильного 0,9%-го физиологического раствора и высевают по 0,1 мл микробной взвеси на чашки Петри с КУА или Бордетелагаром, содержащими дополнительно 10% дефибрированной бараньей крови или крови крупного рогатого скота, и инкубируют при температуре плюс

(36 +/- 1) °C в течение 48 (сорока восьми) часов. Со среды хранения культуру пересевают бактериологической петлей. Выросшую культуру каждого контрольного штамма проверяют визуально на чистоту роста и отсутствие диссоциации;

б) II (второй) пассаж: культуру каждого контрольного штамма бактериологической петлей пересевают на КУА или Бордетелагар с 10% дефибрированной бараньей крови или крови крупного рогатого скота и инкубируют при температуре плюс (36 +/- 1) °C в течение 48 (сорока восьми) часов. После инкубации культуры контрольных штаммов бактериологической петлей переносят в пробирки со стерильным 0,9%-м физиологическим раствором и доводят концентрацию микробной взвеси каждого контрольного штамма до 5 (пяти) единиц по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-86 П), что соответствует 5×10^9 микробных клеток в 1 мл взвеси. Можно использовать денситометр, или стандарт мутности по МакФарланду (при соответствии концентрации клеток бордетелл 5×10^9 в 1 мл), или стандартный образец мутности бактериальных взвесей (СО БАК-5).

75. Для поддержания высокого качества и эффективности проведения лабораторной диагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в лабораториях, осуществляющих исследования, проводится внутрилабораторный контроль качества, который регистрируется в соответствующих журналах.

Внутрилабораторный контроль качества включает:

а) проведение контроля качества всех питательных сред (реактивов и реагентов, наборов реагентов), используемых для приготовления сред первичного посева; сред, наборов реагентов для проведения биохимической идентификации, как приготовленных в лабораторных условиях, так и коммерческих (входной контроль - каждая новая серия питательной среды, каждая новая партия реагентов и наборов реагентов; периодический контроль);

б) контроль проведения биохимических тестов: постановка положительных и отрицательных контролей при проведении биохимической идентификации (каждая постановка).

76. При длительном использовании одной серии сред, реактивов и наборов реагентов внутрилабораторный контроль качества необходимо проводить 1 (один) раз в квартал.

77. К контрольным штаммам микроорганизмов относятся:

а) *B. Pertussis*143 (B-4635), *B. Pertussis*688 (B-4628) или *B. Pertussis*796 (B-4632) используется для оценки ростовых свойств сред первичного посева;

б) *B. Parapertussis*B-7821 используется для проведения биохимической идентификации;

в) *B. Bronchiseptica*B-7822 используется для проведения биохимической идентификации;

г) *P. Aeruginosa* ATCC 27853 (NCTC 12903) используется для проведения биохимической идентификации;

д) *E. Coli* ATCC 25922 используется для проведения биохимической идентификации.

78. Контроль качества питательных сред для культивирования бактерий рода *Bordetella*.

После инкубации культуру контрольного штамма *B. Pertussis* бактериологической петлей переносят в пробирку с 1 мл стерильного 0,9%-го физиологического раствора и доводят концентрацию микробной взвеси контрольного штамма до 5 (пяти) единиц по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-86 П), что соответствует 5×10^9 микробных клеток в 1 мл взвеси.

Полученную микробную взвесь десятикратными разведениями (4,5 мл 0,9%-го физиологического раствора с 0,5 мл микробной взвеси) доводят до разведения 10-5. Далее микробную взвесь контрольного штамма из разведения 10-5 разбавляют в соотношении 1:4 стерильным 0,9%-м физиологическим раствором (условное разведение 10-6). Затем микробную взвесь из условного разведения 10-6 разбавляют в соотношении 1:1 стерильным 0,9%-м физиологическим раствором (условное разведение 10-7) согласно таблице № 7 Приложения № 5 к настоящим МУК.

В процессе разведения перенос взвеси в следующую пробирку производят новой стерильной пипеткой вместимостью 1 мл.

Предварительно поверхность каждой чашки Петри с испытуемой средой условно делят на четыре части. По 0,1 мл микробной взвеси контрольного штамма из всех разведений (исходной - 10⁻⁷, 8 пробирок) высевает каплей на соответствующую часть поверхности двух чашек Петри. Засеянные чашки Петри ставят в термостат, не переворачивая. Через некоторое время, когда капли с культурой впитаются в агар, необходимо чашки перевернуть и далее инкубировать 72 (семьдесят два) часа при температуре плюс (36 +/- 1) °С.

Учет результатов производится визуально. Питательная среда удовлетворяет необходимым ростовым требованиям, если она обеспечивает рост *B. Pertussis* через 72 (семьдесят два) часа инкубации в посевах из разведений 10⁻⁴ и 10⁻⁵ в виде слившихся или плотно расположенных колоний, а из разведений условно 10⁻⁶ и 10⁻⁷ в виде изолированных круглых, выпуклых, влажных, гладких, блестящих колоний с ровными краями диаметром от 0,3 до 1,0 мм; на среде Борде-Жангу с кровью - серебристого цвета, напоминающие капли ртути, или жемчужно-белого, окруженные зоной гемолиза в виде потемнения (почернения) среды; на среде КУА - серого цвета с голубоватым, зеленоватым, жемчужным или беловатым оттенком; на Бордетелагаре - серовато-белого цвета.

79. Внутрिलाбораторный контроль качества сред для определения биохимических свойств проводят путем определения степени выраженности и времени формирования признака у контрольных штаммов (положительные контроли) и отсутствие реакции в отрицательных контролях.

80. Оценка качества сред и постановки пробы для определения подвижности:

а) положительный контрольный образец *B. Bronchiseptica* (B-7822) - наличие диффузного роста по ходу укола, вокруг него и равномерное помутнение (помутнение) отдельных участков столбика питательного агара;

б) отрицательный контрольный образец *B. Parapertussis* (B-7821) - рост строго по ходу укола в виде стержня и отсутствие помутнения среды.

81. Оценка качества сред (реактивов, реагентов) и постановки пробы для определения тирозиназной активности.

Положительный контрольный образец *B. Parapertussis* (B-7821) - окрашивание среды в зоне роста культуры в коричневый цвет по причине образования пигментов.

Отрицательный контрольный образец (контроль реактива) - отсутствие вышеописанного признака в среде без посева культуры.

82. Оценка качества сред (реактивов и реагентов, наборов реагентов) и постановки пробы для определения уреазной активности:

а) положительный контрольный образец *B. Bronchiseptica* (B-7822) - окрашивание среды в малиновый цвет, свидетельствующее о сдвиге pH среды в щелочную сторону, и изменение цвета индикатора под действием расщепления ферментом уреазы мочевины до диоксида углерода и аммиака;

б) отрицательный контрольный образец (контроль реактива) - отсутствие вышеобозначенного признака в среде без посева культуры.

83. Оценка качества сред (реактивов и реагентов, наборов реагентов) и постановки пробы для определения нитратредуктазной активности:

а) положительный контрольный образец *B. Bronchiseptica* (B-7822) - наличие окрашивания среды в красный цвет при восстановлении нитрата до нитрита, катализируемом ферментом нитратредуктазой, после добавления реактива Грисса (Касаткина);

б) отрицательный контрольный образец (контроль реактива) - отсутствие вышеуказанного признака в среде без посева культуры.

84. Оценка качества сред (реактивов, реагентов) и постановки пробы для определения способности расти на цитратном агаре Симмонса:

а) положительный контрольный образец *B. Bronchiseptica* (B-7822) - изменение цвета скошенной части среды с зеленого на интенсивно-синий;

б) отрицательный контрольный образец (контроль реактива) - отсутствие этого признака в среде без посева культуры.

85. Оценка качества реактивов и реагентов (наборов реагентов) и постановки пробы для определения оксидазной активности:

а) положительный контрольный образец (*P. Aeruginosa* ATCC 27853) - появление фиолетово-коричневого, синего или темно-фиолетового окрашивания колонии или штриха, нанесенного на фильтровальную бумагу или тестовую полоску;

б) отрицательный контрольный образец (*E. Coli* ATCC 25922) - признак отсутствует у контрольного штамма.

Глава 14. Молекулярно-генетическая диагностика

86. Молекулярно-генетическая диагностика применяется при обследовании пациентов с различными формами клинического течения болезни на 1 (первой) – 4 (четвертой) неделях от начала заболевания как с диагностической целью, так и по эпидемиологическим показаниям.

87. Взятие биологического материала проводится согласно пунктам 15-17 настоящих МУК.

88. Материалом для ПЦР-исследования на коклюш у детей и взрослых служит слизь из верхних дыхательных путей, осаждающаяся при кашле на задней стенке ротоглотки. Взятие клинического материала осуществляют через ротовую полость с задней стенки ротоглотки последовательно двумя сухими стерильными зондами из полистирола с вязкими тампонами (или универсальными велюр-тампонами на пластиковом аппликаторе с нейлоновым наконечником). Сначала необходимо аккуратно прижать язык пациента индивидуальным шпателем. Чтобы стимулировать кашель, первый сухой стерильный зонд вводят в ротовую полость и, не касаясь щек и языка, проводят по задней стенке ротоглотки. После откашливания второй зонд вводят через рот и собирают слизь тампоном с задней стенки ротоглотки. У детей раннего возраста (1 - 2 месяца) допускается взятие материала с помощью педиатрических велюр-тампонов. После взятия материала часть зонда с тампоном помещают в одну пробирку объемом 2 мл с 0,5 мл физиологического раствора или транспортной среды для ПЦР. Рукоятку зондов отламывают движениями вниз-вверх-вниз, придерживая тампоны (зонд из полистирола с вязким тампоном погружают на глубину 1,0 - 1,2 см, универсальный велюр-тампон - на 3 см до места слома) сверху крышки пробирки. Оба зонда объединяют в одну пробу и исследуют как одну пробу. Пробирку герметично закрывают, маркируют и помещают в индивидуальный полиэтиленовый пакет.

89. Дополнительным материалом для ПЦР-исследования (с целью дифференциальной диагностики с респираторно-вирусными инфекциями) может служить мазок со слизистой носоглотки, собираемый назофарингеальным велюр-тампоном через нижний носовой ход. В этом случае у пациента берут два мазка с помощью 2 (двух) разных зондов - сначала мазок со слизистой задней стенки ротоглотки (описанным выше способом), затем - мазок из носоглотки. Зонды отламывают последовательно в одну и ту же пробирку с физиологическим раствором или транспортной средой и исследуют как одну пробу.

90. Допускается хранение биологического материала в течение 3 (трех) суток при температуре плюс (2 - 8) °С, более длительно - при температуре не выше минус 16 °С.

91. Пробирка с биологическим материалом проверяется визуально на герметичность и маркируется в соответствии с прилагаемым списком в направлении (согласно пункту 18 настоящих МУК).

92. При необходимости транспортирования внутри одного здания пробирки с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные

контейнеры-переноски. Транспортирование производится при комнатной температуре или при температуре плюс (2 - 8) °С.

При необходимости транспортирования биологического материала в другие организации образцы от каждого пациента помещают в индивидуальный герметичный пакет и дополнительно упаковывают в общий герметичный пакет, помещаемый в термоконтейнер с международным знаком «Биологическая опасность». Транспортирование производится в термоконтейнерах, приспособленных для транспортирования биологических материалов, при температуре плюс (2 - 8) °С, соблюдение которой (по возможности) контролируется специальными индикаторами.

93. Медицинский персонал МО проводит исследования методом ПЦР в соответствии с инструкциями, правилами безопасности, изложенными в технических паспортах к приборам и в инструкциях к диагностическим наборам реагентов.

94. Исследование проводится с применением наборов реагентов, зарегистрированных и разрешенных для использования на территории Приднестровской Молдавской Республики.

95. Анализ является односторонним, и разные его этапы проводятся в отдельных помещениях - зонах. Работа начинается в зоне экстракции нуклеиновых кислот, продолжается в зонах амплификации и детекции. Образцы, оборудование и реактивы не возвращаются в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы являются стационарными - их не переносят из 1 (одного) помещения в другое. Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы утилизируются.

При работе методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени не допускается открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов. При работе методом ПЦР с детекцией методом электрофореза пробирки с продуктами ПЦР открываются в помещении при проведении электрофореза. Персонал и любые предметы из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории не перемещаются. При выходе из помещения для электрофореза производится смена рабочей верхней одежды, головных уборов и обуви.

С целью обеззараживания исследуемого материала и отработанных отходов предусматривается наличие автоклавной комнаты, которая может быть общей с другими лабораторными подразделениями учреждения при условии соблюдения требований биологической безопасности.

Подготовка биологического материала для ПЦР-исследования

96. Непосредственно перед исследованием содержимое закрытой пробирки с мазками требуется тщательно перемешать на вортексе, придерживая крышку пробирки, и центрифугировать в течение 5 (пяти) секунд при 5000об./мин на микроцентрифуге с целью удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Затем следует открыть пробирку и, не извлекая зондов, отобрать необходимое количество образца для исследования.

97. Порядок проведения ПЦР-исследования и интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с инструкцией изготовителя используемого набора реагентов.

98. ПЦР является методом молекулярно-генетической диагностики, позволяющим обнаруживать специфичные участки генома бактерий. В его основе лежит амплификация, то есть многократное увеличение количества фрагмента ДНК возбудителя. Цикличность реакции достигается путем многократного (от 40 (сорока) до 45 (сорока пяти) раз) последовательного повторения шагов инкубации реакционной смеси при температурах плюс (90 - 95) °С (денатурация ДНК), плюс (50 - 65) °С (отжиг праймеров), плюс (60 - 72) °С (элонгация или синтез цепи ДНК).

ПЦР-исследование состоит из нескольких этапов:

- а) экстракция ДНК из образцов исследуемого биологического материала;
- б) амплификация ДНК;
- в) детекция, анализ и интерпретация результатов.

99. Для диагностики коклюшной инфекции могут применяться варианты ПЦР, различающиеся способом детекции фрагментов амплификации: ПЦР с детекцией методом электрофореза, с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (далее - ПЦР-РВ) или по окончании ПЦР (далее - ПЦР-КТ).

Детекция и анализ результатов различаются в зависимости от варианта ПЦР. Для некоторых вариантов ПЦР помимо амплификаторов (термоциклеров) требуется дополнительное оборудование для детекции и анализа результатов (например, прибор для детекции флуоресценции при ПЦР-КТ и дополнительное оборудование для разделения ДНК методом электрофореза и визуализации ДНК в агарозном геле).

100. С целью упрощения и ускорения анализа результатов можно использовать программное обеспечение, рекомендованное производителем диагностического набора реагентов.

101. Результатом анализа могут быть следующие варианты, формулируемые в заключении в зависимости от типа и специфичности используемой тест-системы:

- а) ДНКВ. *Pertussis* (или) ДНК возбудителей заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, обнаружена;
- б) ДНК бактерий рода *Bordetella* обнаружена.

В случае получения сомнительного результата, требующего повторного сбора и исследования биологического материала, в заключении указывают: «Результат сомнительный, требуется повторить сбор и исследование биологического материала».

102. Отчетная документация оформляется на бумажном и электронном носителях в виде отчетов по результатам экспериментов, формируемых программой для анализа результатов ПЦР (видеосистемой при детекции методом электрофореза), которые должны содержать коды и результаты исследования биологических образцов пациента и контрольных образцов. Файлы постановок экспериментов сохраняются на электронном или бумажном носителях в течение 3 (трех) лет в соответствии с законодательством Приднестровской Молдавской Республики.

103. Результаты ПЦР-исследования учитываются в совокупности с клинико-эпидемиологическими данными на пациента.

104. С целью предотвращения появления недостоверных, в том числе ложноположительных, результатов необходимо соблюдать требования по организации лаборатории, правила работы персонала с оборудованием и реактивами и требования, указанные в инструкции и методических рекомендациях производителей конкретного набора реагентов. Характеристики диагностических наборов, установленные разработчиком, воспроизводятся при условии соблюдения всех требований и рекомендаций, включая использование оборудования, комплектов реагентов, соблюдение всех этапов и процедур исследования от момента сбора биологического материала до интерпретации результатов.

105. При проведении исследования используются положительные и отрицательные контроли для всех этапов анализа. Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные (в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов) результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК.

106. С целью обеспечения внутрилабораторного контроля качества ПЦР-анализа периодически (не реже 1 (одного) раза в месяц) и незамедлительно при подозрении на загрязнение лаборатории фрагментами амплификации ДНК (появление положительной реакции в отрицательных контрольных образцах ПЦР) требуется проводить контроль контаминации лаборатории продуктами ПЦР путем взятия смывов (согласно Приложению № 6 к настоящим МУК).

В случае получения постоянных положительных сигналов в отрицательных контролях все используемые реагенты подлежат замене, незамедлительно проводится обработка лабораторных помещений препаратами, разрушающими ДНК, и облучением в ультрафиолетовом спектре с записью в журнале аварийных ситуаций.

Глава 15. Серологическая диагностика

107. Серологическую диагностику коклюша проводят методом ИФА с использованием наборов реагентов для определения уровня специфических противокклюшных антител классов М, А и G (IgM, IgA, IgG). В тест-системах ИФА в качестве антигенов использованы обогащенные фракции коклюшного токсина или коклюшного токсина и ФГА.

108. Исследование проводят начиная с 3 (третьей) недели болезни.

109. Для исследования используется сыворотка крови. Возможно использование плазмы крови, если это указано в инструкции производителя тест-системы для постановки ИФА.

110. Взятие крови проводят натошак из вены в объеме 3 - 4 мл в стерильную пробирку - сухую или вакуумную пробирку с разделительным гелем. Также кровь можно взять из подушечки третьей фаланги среднего пальца в объеме 0,5 - 1,0 мл (у детей младшего возраста) в стерильную пробирку - сухую или с активатором свертывания сгустка.

111. Пробу крови отстаивают при комнатной температуре в течение 30 (тридцати) минут или помещают в термостат при плюс (37 +/- 1) °С на 15 (пятнадцать) минут. Затем проводится центрифугирование в течение 10 (десяти) минут при 3000 об./мин. По окончании центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку (например, типа «Эппендорф»).

112. Образцы сывороток крови хранятся при комнатной температуре плюс (18 - 25) °С в течение 6 (шести) часов, при температуре плюс (2 - 8) °С - в течение суток. Для более длительного хранения образцы необходимо разделить на аликвоты и заморозить при температуре не выше минус 16 °С. Многократное замораживание (размораживание) сыворотки крови недопустимо.

113. Пробирка с биологическим материалом визуально проверяется на герметичность и маркируется в соответствии с прилагаемым списком в направлении (согласно пункту 18 настоящих МУК).

114. При необходимости транспортирования внутри одного здания пробирки с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные контейнеры-переноски. Транспортирование производится при комнатной температуре или при температуре плюс (2 - 8) °С.

115. При необходимости транспортирования биологического материала в другие организации образцы от каждого пациента помещают в индивидуальный герметичный пакет и дополнительно упаковывают в общий герметичный пакет подходящего размера с адсорбирующим материалом в количестве, достаточном для адсорбции всего образца в случае его утечки. Пакет герметично закрывают. Полиэтиленовый пакет помещают в термоизолирующий контейнер (сумку-холодильник), приспособленный для транспортирования биологических материалов, и транспортируют при температуре плюс (2 - 8) °С, соблюдение которой (по возможности) контролируется специальными индикаторами.

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

116. Для исследования используется сыворотка крови. Возможно использование плазмы крови, если это указано в инструкции производителя. Не допускается использование мутных вследствие липемии и гемолизированных образцов. Такие образцы перед исследованием должны быть процентрифугированы при 3000 тысяч об./мин в течение 10 (десяти) минут.

В этом случае рекомендуется повторное взятие образца крови.

117. Постановка ИФА осуществляется согласно инструкции производителя диагностического набора.

118. Перед началом работы тест-систему достают из холодильника, открывают крышку и оставляют на столе на 30 (тридцать) минут для того, чтобы все компоненты набора были доведены до комнатной температуры. Затем достают все реактивы, необходимые для постановки. Разрезают алюминиевый пакет выше «застежки-молнии» и достают необходимое количество стрипов, помещают в рамку, закрывают крышкой и оставляют на столе. После каждого взятия стрипов алюминиевый пакет должен плотно закрываться вместе с влагопоглощающей прокладкой.

119. Исследуемые образцы сывороток перемешивают на вортексе (3000 об. /мин) и разводят согласно прилагаемой инструкции к тест-системе (как правило, это разведения 1:100 или 1:50) в пробирках или в плашке для предварительного разведения. Для определения IgM в некоторых тест-системах требуется предварительная инкубация с IgG/RF-адсорбентом в течение 15 - 20 минут. Далее исследуемые образцы сывороток и контроли вносят в плашку по схеме, предлагаемой в инструкции, и инкубируют заклеенными инкубационной пленкой в термостате при плюс (37 +/- 1) °C необходимое время (30 (тридцать) или 60 (шестьдесят) минут).

120. Приготовление промывочного буфера производят согласно инструкции, прилагаемой к тест-системе. Для этого одну часть концентрата промывочного буфера (10х) смешивают с девятью частями (1 + 9) дистиллированной или деионизованной воды (например, 50 мл концентрата промывочного буфера (10х) - с 450 мл воды) или одну часть концентрата (20х) с девятнадцатью частями (1 + 19) дистиллированной или деионизованной воды (например, 50 мл концентрата промывочного буфера (20х) - с 950 мл воды). На каждый стрип необходимо 10 мл разведенного промывочного буфера.

121. После окончания инкубации плашку помещают в вошер для промывания, производят необходимое количество промывок (3 или 4 в объеме 300 мкл) согласно инструкции, после которых плашку переворачивают на фильтровальную бумагу для удаления оставшегося промывочного буфера.

122. На следующем этапе в плашку вносят конъюгаты для выявления специфических IgM, IgA и IgG. Конъюгаты могут быть в готовом для использования виде или требуют предварительного разведения (например, 1:300 или другое). Необходимое количество конъюгата отбирается из флакона чистым наконечником, помещается в чистую кювету и вносится в плашку (остатки конъюгата сливать обратно во флакон нельзя). Для каждого конъюгата (IgM, IgA, IgG) используется чистая кювета, предварительно маркированная. Плашку с конъюгатом, заклеенную инкубационной пленкой, инкубируют в термостате при плюс (37 +/- 1) °C или оставляют при комнатной температуре плюс (18 - 25) °C на необходимое время (30 (тридцать) или 60 (шестьдесят) минут) согласно инструкции. Затем производят промывку в вошере (3 (три) или 4 (четыре) раза в объеме 300 мкл), переворачивают на фильтровальную бумагу для удаления оставшегося промывочного буфера.

123. На следующем этапе в плашку вносят субстратный буфер - ТМБ (тетраметилбензидин) и помещают в термостат при плюс (37 +/- 1) °C или оставляют при комнатной температуре плюс (18 - 25) °C закрытыми крышками на необходимое время согласно инструкции (15 (пятнадцать) или 30 (тридцать) минут). По окончании инкубации реакцию останавливают внесением в лунки плашки стоп-реагента согласно инструкции. Считывание результатов проводят на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм или при двух длинах волн (450 и 620 - 650 нм). Перед фотометрическим считыванием необходимо очистить наружную поверхность дна лунок и проследить, чтобы в лунках отсутствовали воздушные пузырьки. Считывание необходимо производить в течение 15 (пятнадцати) минут после добавления стоп-раствора.

124. Интерпретация полученных результатов проводится согласно инструкции, прилагаемой к тест-системе. Полученные результаты могут выражаться в Ед./мл, индексе СОИ или в других показателях.

125. Отрицательный результат серологического исследования не исключает инфицирование возбудителем коклюша. Результаты серологических исследований интерпретируют в совокупности с клинической картиной болезни.

126. Тактика серологического исследования и интерпретация результатов должна строиться с учетом закономерностей формирования иммунного ответа у непривитых и привитых лиц.

127. У непривитых детей в начале острой стадии коклюша формируются IgM, которые можно выявить начиная со 2 (второй) недели болезни. Отрицательный результат по определению антител этого класса в первые 2 (две) недели не исключает инфицирование возбудителем коклюша, так как отрицательный результат теста может быть связан с низким уровнем антител. Острый процесс и прогрессирование заболевания сопровождается появлением IgA и IgG на 2 - 3-й неделе заболевания.

Подтверждением клинического диагноза «коклюш» у непривитых больных является выявление при однократном исследовании сыворотки крови IgM, и (или) IgA, и (или) IgG. В случае получения отрицательных результатов исследование повторяют через 14 (четырнадцать) и более дней. При этом исследование образцов парных сывороток рекомендуется проводить на одной панели, для чего первый образец сыворотки сохраняют.

При интерпретации результатов анализа у заболевших коклюшем детей первых месяцев жизни следует учитывать возможную замедленную сероконверсию. Специфические противококлюшные антитела у данной возрастной группы могут быть выявлены в отдаленные сроки после выздоровления (через 1 - 3 месяца). В данном случае при подтверждении диагноза следует учитывать клиническую картину заболевания и результаты бактериологического и молекулярно-генетического обследования.

При заболевании детей первых месяцев жизни целесообразно проводить исследование парных сывороток крови одновременно ребенка и матери (как наиболее вероятного источника инфекции), а также других членов семьи при наличии у последних клинической картины коклюша.

128. У детей, привитых против коклюша, в том числе утративших со временем поствакцинальные антитела, иммунный ответ формируется по вторичному типу: на 2 - 3-й неделе заболевания происходит интенсивное нарастание IgG, уровень которых превышает пороговый в 4 (четыре) и более раз, или на фоне низкой продукции IgM происходит быстрое нарастание IgA, а в дальнейшем IgG в показателях, превышающих референсный пороговый уровень в 4 (четыре) и более раз. В случае получения отрицательных результатов исследование повторяют через 14 (четырнадцать) и более дней.

Подтверждением клинического диагноза «коклюш» у привитых больных является выявление при однократном исследовании сыворотки крови IgA и (или) четырехкратное нарастание уровня IgG при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом 14 (четырнадцать) и более дней. При планировании исследования парных сывороток от привитых лиц взятие первого образца допустимо производить независимо от сроков заболевания. Исследование образцов парных сывороток рекомендуется проводить на одной панели.

129. У взрослых иммунный ответ на инфицирование может проходить как по первичному типу с образованием IgM, IgA и IgG, так и по вторичному типу с интенсивным нарастанием IgG и IgA, причем вторичный тип иммунного ответа является доминирующим. Уровень IgA может достигать высоких значений и превышать уровень IgG. Порядок обследования взрослых такой же, как для непривитых и привитых детей.

130. Выдача ответа осуществляется согласно пункту 21 настоящих МУК.

Приложение № 1
к Методическим указаниям МУК МЗ ПМР 4.2.3701-24
«Лабораторная диагностика коклюша и
заболеваний, обусловленных другими бордетеллами»

Таблица № 1

Сроки формирования колоний представителей рода *Bordetella*

Характеристика колоний	Вид микроорганизма		
	<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Сроки образования колоний	48 - 72 часа	24 - 48 часа	18 - 24 часа
Диаметр колоний	Очень мелкие, до 1 мм	Мелкие, до 1,5 мм	1 - 2 мм

Таблица № 2

Дифференцирующие признаки клинически значимых микроорганизмов рода *Bordetella*

Микроорганизмы	Рост на кровяном агаре	Оксид азота	Уреаза	Тирозиназа	Восстановление нитратов	Утилизация цитрата вна Симмонса	Подвижность	Рост на мясопептонном агаре
<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>	+	-	-	-	+/	-	+	
<i>B. petrii</i>	+	+	-	-	-	+	-	
<i>B. ansorpii</i>	+	-	-	-	-	+	+	

Примечание:

«+» положительный результат;

«-» отрицательный результат;

* через 4 (четыре) часа.

Таблица № 3

Агглютиногены бактерий рода *Bordetella*

Микроорганизмы	Родовой АГТ	Видовые АГТ	Внутривидовые АГТ
<i>B. pertussis</i>		1, 2, 3	1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 16
<i>B. parapertussis</i>	7	14	8, 9, 10
<i>B. bronchiseptica</i>		12	8, 9, 10, 11

Сроки использования различных методов диагностики в зависимости от возраста и прививочного анамнеза

Сроки обследования Категории обследуемых	1 - 2 недели от начала заболевания	3-я неделя от начала заболевания		3 недели и более от начала заболевания
	независимо от лечения	без приема антибиотиков	на фоне приема антибиотиков	независимо от лечения
Непривитые дети в возрасте до 1 года**	БМ *; ПЦР	БМ *; ПЦР; ИФА	ПЦР; БМ *; ИФА	ИФА; ПЦР
Непривитые дети в возрасте старше 1 года	БМ *; ПЦР	ПЦР; БМ *; ИФА	ПЦР; ИФА; БМ *	ИФА; ПЦР
Привитые дети***, дети в возрасте до 14 лет, взрослые	ПЦР; БМ *	ПЦР; ИФА; БМ *	ИФА; ПЦР; БМ *	ИФА; ПЦР
Примечание: в каждой графе последовательность использования методов указана в порядке убывания их эффективности у данной группы пациентов.				
* бактериологический метод;				
** у детей 1 года жизни наблюдается замедленная сероконверсия, поэтому целесообразно проводить серологическое исследование на более поздних сроках заболевания и исследовать парные сыворотки крови одновременно ребенка и матери;				
*** в течение 1 года после вакцинации против коклюша проводить серологическое обследование в диагностических целях не рекомендуется, так как интерпретация результатов затруднена				

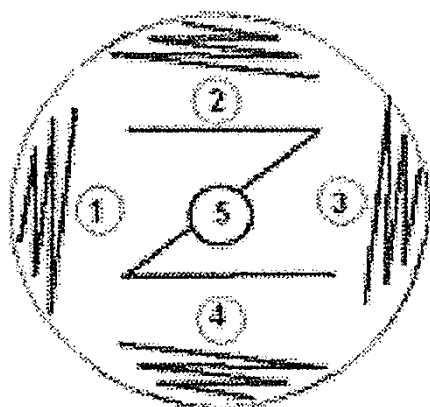


Рисунок 1.Схема бактериологического посева

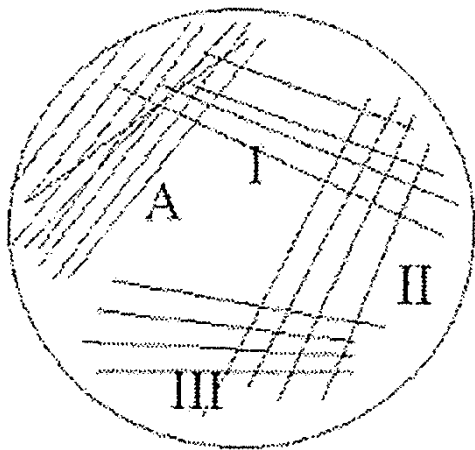


Рисунок 2.Схема бактериологического посева (по Голду)

Приложение № 2
к Методическим указаниям МУК МЗ ПМР 4.2.3701-24
«Лабораторная диагностика коклюша и
заболеваний, обусловленных другими бордетеллами»

Материально-техническое обеспечение бактериологического метода

Таблица № 1

Средства измерений

Наименование средств измерения
Весы лабораторные
рН-метр
Механические или электронные одноканальные или многоканальные дозаторы переменного объема 5 - 50, 50 - 200 и 200 - 1000 мкл
Цилиндры мерные 1 класса точности вместимостью 50 и 1000 см ³

Таблица № 2

Вспомогательные устройства и материалы

Наименование аппаратуры и материалов
Термостат, поддерживающий температуру плюс (37 +/- 1) °С
Холодильник фармацевтический, поддерживающий температуру плюс (2 - 8) °С
Морозильник фармацевтический, поддерживающий температуру минус (18 - 35) °С
Микроскоп биологический стереоскопический
Микроскоп биологический с иммерсионной системой
Водяная баня лабораторная
Флаконы стеклянные
Чашки биологические (Петри) стеклянные или одноразовые из полимерных материалов
Петля микробиологическая диаметром 1 - 3 мм многоразовая платиновая или одноразовая из полимерных материалов
Пипетки градуированные стеклянные
Пинцет медицинский
Пробирки лабораторные
Штативы для пробирок лабораторных
Шпатель Дригальского
Отраслевой стандартный образец мутности 5 МЕ
Предметные стекла для микропрепаратов, предназначенные для микрокопирования в видимой области спектра
Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и 1000 мкл
Вата медицинская гигроскопическая
Бумага фильтровальная лабораторная

Питательные среды и реактивы

Наименование питательных сред и реактивов
Агар микробиологический
Бордетелагар
Бульон мясо-пептонный
Казеиново-угольный агар
Питательная среда для определения восстановления нитратов в нитриты (Среда ГРМ N 7)
Питательная среда для первичной идентификации энтеробактерий сухая(железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной)
Цитратный агар Симмонса (Среда ГРМ N 14)
Аммоний фосфорнокислый однозамещенный («Чистый для анализа» (далее - ч.д.а.))
Вода дистиллированная
Гидролизат Хоттингера
Калий фосфорнокислый однозамещенный (ч.д.а.)
Калий фосфорнокислый двузамещенный (ч.д.а.)
Натрий хлористый (ч.д.а.)
Реактив Грисса (ч.д.а.)
L-Тирозин
Мочевина
Крезоловый красный
Натрий фосфорнокислый двузамещенный
Феноловый красный (фенолрот)
96%-й спирт этиловый
Натрий лимоннокислый 5,5-водный
Магний сернокислый 7-водный
Бромтимоловый синий
Система индикаторная бумажная (СИБ) для постановки оксидазного теста
Тест-полоски для обнаружения цитохромоксидазы
Реактив для теста Оксидаза
Кровь крупного рогатого скота для питательных сред, дефибринированная
Кровь баранья, дефибринированная
Пенициллин
Цефалексин
Сыворотка диагностическая коклюшная агглютинирующая
Сыворотка диагностическая паракоклюшная агглютинирующая
Сыворотки к агглютиногенам (факторам) 1, 2, 3 коклюшного микроба и 14 - паракоклюшного микроба

Примечание: допускается использование средств измерений, вспомогательного оборудования и материалов с аналогичными или лучшими характеристиками; допускается использование других реактивов с аналогичными характеристиками.

Приложение № 3
к Методическим указаниям МУК МЗ ПМР 4.2.3701-24
«Лабораторная диагностика коклюша и
заболеваний, обусловленных другими бордетеллами»

Материально-техническое обеспечение метода ПЦР

Таблица № 1

Средства измерений

Наименование средств измерения
Автоматические или электронные калиброванные дозаторы и многоканальные дозаторы (диапазоны объемов 5 - 50, 50 - 200 и 200 - 1000 мкл) и одноразовые сменные наконечники
Мерный цилиндр на 100 мл и на 1 л
Колба коническая из термостойкого стекла на 250 мл для плавления агарозы

Вспомогательные устройства и материалы

Наименование аппаратуры и материалов
Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл
Зонд из полистирола с вязким тампоном в индивидуальной упаковке, стерильный
Универсальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе с нейлоновым наконечником и расстоянием до места слома 3 см в индивидуальной упаковке, стерильный
Ламинарный бокс, класс биологической безопасности II тип А
Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» от плюс (25 - 100) °С
Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 - 2 мл до 16 тысяч об./мин
Микроцентрифуга (вортекс)
Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости
В случае использования автоматизированной экстракции ДНК: автоматическая станция для выделения ДНК/РНК
Холодильник с камерами, поддерживающими температуру плюс (2 - 8) °С и не выше минус 16 °С (для хранения наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот). Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру плюс (2 - 8) °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру не выше минус 16 °С
Холодильник с камерой, поддерживающей температуру плюс (2 - 8) °С (для хранения препаратов нуклеиновых кислот) или морозильная камера при температуре не выше минус 20 °С. Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот
Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл и наконечников
Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки типа "Эппендорф" объемом 1,5 мл
Наконечники
Емкость для дезинфицирующего раствора
Емкость для 70% спирта этилового
Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс)
Приборы, рекомендованные в инструкциях и методических рекомендациях по применению используемых в лаборатории наборов реагентов для выявления ДНК возбудителей коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, методом ПЦР или ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентной детекцией или приборы, обеспечивающие аналогичные параметры проведения ПЦР и регистрации продуктов амплификации
Флуориметр (флуоресцентный детектор) - только при использовании учета продуктов амплификации с гибридационно-флуоресцентным методом детекции по конечной точке
Микроцентрифуга/вортекс
Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл
Штативы для наконечников
Наконечники, пробирки типа «Эппендорф»
Холодильник плюс (2 - 8) °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для хранения выделенных проб ДНК
Емкость для сброса отработанных расходных материалов
С целью автоматизации процедуры приготовления реакционных смесей для амплификации допускается использование автоматизированного оборудования для распыления реагентов
Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс)
Программируемый амплификатор (термоциклер), рекомендованный в инструкциях и методических рекомендациях по применению используемого набора реагентов для ПЦР с детекцией методом электрофореза
Микроцентрифуга (вортекс)
Холодильник плюс (2 - 8) °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С
Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл
Источник постоянного тока с напряжением 150 - 460 В
Ультрафиолетовый транслюминатор с кабинетом для просмотра гелей

Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов и передачи изображения
Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в чистой зоне и предназначенным для анализа результатов электрофореза)
Аквадистиллятор
Холодильник с камерой, поддерживающей температуру плюс (2 - 8) °С (для хранения наборов электрофоретической детекции)
Микроволновая печь или другой нагревательный прибор для плавления агарозы
Столик и набор гребенок для приготовления геля
Штативы для наконечников и пробирок на 0,5 (0,2) мл
Наконечники, пробирки типа «Эппендорф»
Емкость для сброса отработанных расходных материалов в дезинфицирующий раствор
Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия

Таблица № 3

Реактивы и диагностические препараты

Наименование реактивов и диагностических препаратов
Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков или стерильный 0,9%-й раствор натрия хлорида, в аликвотах по 0,5 мл в стерильных пробирках объемом 1,5 мл, распапанный в стерильных условиях

Примечание: допускается использование средств измерений, вспомогательного оборудования и материалов с аналогичными или лучшими характеристиками; допускается использование других реактивов с аналогичными характеристиками.

Приложение № 4
к Методическим указаниям МУК МЗ ПМР 4.2.3701-24
«Лабораторная диагностика коклюша и
заболеваний, обусловленных другими бордетеллами»

Материально-техническое обеспечение метода ИФА

Таблица № 1

Средства измерений

Наименование средств измерения
Цилиндры мерные 1 класса точности вместимостью 50 и 1000 см ³
Механические или электронные одноканальные или многоканальные дозаторы переменного объема 5 - 50, 50 - 200 и 200 - 1000 мкл
Фотометр микропланшетный с фильтрами 450 нм и 620 - 650 нм

Таблица № 2

Вспомогательные устройства и материалы

Наименование аппаратуры и материалов
Холодильник фармацевтический, поддерживающий температуру плюс (2 - 8) °С
Морозильник фармацевтический, поддерживающий температуру минус (18 - 35) °С
Термостат, поддерживающий температуру плюс (37 +/- 1) °С
Флаконы стеклянные
Штативы для пробирок
Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и 1000 мкл
Плашки для разведения образцов сыворотки
Бутыль для промывочного буфера
Кюветы для промывочного буфера, конъюгата, субстрата, стоп-раствора
Бумага фильтровальная лабораторная

Реактивы и диагностические препараты

Наименование реактивов и диагностических препаратов
Наборы реагентов для определения антител (IgG, IgA, IgM) кВ. pertussis
Вода дистиллированная

Примечание: допускается использование средств измерений, вспомогательного оборудования и материалов с аналогичными или лучшими характеристиками; допускается использование других реактивов с аналогичными характеристиками.

Приложение № 5
к Методическим указаниям МУК МЗ ПМР 4.2.3701-24
«Лабораторная диагностика коклюша и
заболеваний, обусловленных другими бордетеллами»

Таблица № 1

Состав Бордетелагара

Наименование компонента	Используемое количество
Солянокислотный гидролизат казеина	12,0 г/л
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов	1,0 г/л
Панкреатический гидролизат казеина	8,0 г/л
Дрожжевой экстракт	5,0 г/л
Натрий хлористый	1,0 г/л
Крахмал	2,0 г/л
Уголь активный	5,0 г/л
Натрий углекислый	0,5 - 0,7 г/л
Магний сернокислый 7-водный	0,4 г/л
Медь сернокислая 5-водная	0,005 г/л
Железо сернокислое 7-водное	0,01 г/л
Цистеина гидрохлорид	0,03 г/л
Кислота аскорбиновая	0,02 г/л
Агар	(12,0 +/- 2,0) г/л *
*Примечание: варьирование величины связано с различной прочностью студня агара	

Таблица № 2

Состав Казеиново-угольного агара

Наименование компонента	Используемое количество
Кислотный гидролизат казеина	(130 - 150) мг % *
Экстракт дрожжей хлебопекарных	100 мл или 5,0 г/л
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,5 г/л
Крахмал растворимый	1,5 г/л
Уголь активированный	3,0 г/л
Магний хлористый	0,4 г/л
Медь сернокислая 5-водная	0,005 г/л
Цистеина гидрохлорид	0,03 г/л
Агар	(12,0 - 20,0) г/л **
Примечание:	
* из расчета содержания аминного азота в среде;	
** в зависимости от прочности агара	

Таблица № 3

Состав полужидкого питательного агара

Наименование компонента	Используемое количество
Натрий хлористый	5 г
Гидролизат Хоттингера	(120 - 150) мл
Агар	(3 - 4) г
Вода дистиллированная	1 000 мл

Таблица № 4

Приготовление реактивов для определения уреазной активности по методу Заксе

Наименование реактива	Наименование компонента	Используемое количество	Условия стерилизации
Реактив А	Мочевина	2 г	Не стерилизуют
	Спирт этиловый 96%-й	2 мл	
	Вода дистиллированная	4 мл	
Реактив В	0,2%-й раствор фенолрот	1 мл	Стерилизуют в автоклаве текущим паром при плюс (100 +/- 1) °С в течение 30 - 60 минут в зависимости от объема раствора
	Однозамещенный фосфат калия	0,1 г	
	Двухзамещенный фосфат калия	0,1 г	
	Натрий хлористый	0,5 г	
	Вода дистиллированная	100 мл	

Таблица № 5

Состав железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной

Наименование компонента	Используемое количество
Панкреатический гидролизат рыбной муки сухой с тиосульфатом натрия	20,5 г/л
Д(+) - лактоза 1-водная	20,0 г/л
Д - глюкоза	1,0 г/л
Натрий фосфорнокислый двухзамещенный	1,0 г/л
Калий фосфорнокислый однозамещенный	1,3 г/л
Натрий хлористый	5,0 г/л

Железо (III) цитрат, водное или железо (III) лимоннокислое	0,3 г/л
Феноловый красный	0,05 г/л
Мочевина	10,0 г/л
Натрий углекислый	(0,01 - 0,25) г/л
Агар микробиологический	(10,0 +/- 3,0) г/л*
*Примечание: варьирование величины связано с различной прочностью студня агара.	

Таблица № 6

Состав цитратного агара Симмонса

Наименование компонента	Используемое количество
Однозамещенный фосфорнокислый аммоний	1,0 г/л
Двузамещенный фосфат калия	1,0 г/л
Натрий хлористый	5,0 г/л
Цитрат натрия	2,0 г/л
Сульфат магния	0,2 г/л
Бромтимоловый синий	0,08 г/л
Агар-агар	13,0 г/л

Таблица № 7

Схема приготовления разведений коклюшной культуры для контроля качества питательных сред

Номер пробирки	Разведение	Количество физиологического раствора, мл	Объем вносимой суспензии, мл	Условное количество микробных клеток в 1 мл взвеси
1	исходная взвесь	2	-	5 x 10 ⁹
2	10-1	4,5	0,5 из исходной взвеси	5 x 10 ⁸
3	10-2	4,5	0,5 из разведения 10-1	5 x 10 ⁷
4	10-3	4,5	0,5 из разведения 10-2	5 x 10 ⁶
5	10-4	4,5	0,5 из разведения 10-3	5 x 10 ⁵
6	10-5	4,5	0,5 из разведения 10-4	5 x 10 ⁴
7	условное 10-6	2,0	0,5 из разведения 10-5	1 x 10 ⁴
8	условное 10-7	1,0	1,0 из разведения 10-6	5 x 10 ³

Проведение смывов для контроля контаминации лаборатории продуктами ПЦР

1. Процедуру рекомендуется проводить с необходимой периодичностью в зависимости от интенсивности работы (не реже, чем 1 (один) раз в месяц; при ежедневном проведении исследований 1 (один) раз в неделю) либо в случае получения положительных сигналов при амплификации отрицательных контролей этапов ПЦР.

2. Взятие смывов проводят в первой половине рабочего дня. Контрольные точки для смывов должны включать: рабочие и контактные поверхности лабораторного оборудования (автоматические дозаторы, центрифуги, микроцентрифуги (вортексы), амплификаторы, термостаты, холодильники); поверхности лабораторных материалов (штативы, пакеты с реактивами, упаковки расходных материалов, ножницы, пинцеты, маркеры и другое); рабочие и контактные поверхности лабораторных столов, боксов, ламинарных шкафов; прочие контактные поверхности (ручки дверей, кнопки компьютеров, компьютерные мыши, телефоны, компьютерные столы, прочая лабораторная мебель). При наличии отдельных помещений для размещения амплификаторов забор производится из тех же точек.

3. Необходимые материалы:

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

4. Список контрольных точек, с которых производится взятие смывов:

- а) рукоятки пипеток в зоне выделения ДНК;
- б) поверхность термостата в зоне выделения ДНК;
- в) ручки холодильников в зоне ПЦР;
- г) рукоятки ламинарных шкафов в зоне ПЦР;
- д) поверхность вортекса в зоне ПЦР;
- е) рукоятки дозаторов в зоне ПЦР;
- ж) ручки дверей всех лабораторных помещений;
- з) корпус и блоки приборов для ПЦР;
- и) клавиатура компьютеров в зоне ПЦР;
- к) телефон (если имеется в рабочих зонах).

5. Процедура взятия смывов:

а) надеть перчатки, протереть их салфеткой, смоченной 70%-м раствором этилового спирта;

б) в стерильных условиях отобрать необходимое количество стерильных пробирок объемом 1,5 - 2 мл и в каждую пробирку внести 300 мкл ТЕ-буфера (деионизованной воды);

в) промаркировать пробирки в соответствии с названиями контрольных точек;

г) взять смывы с каждой контрольной точки (в соответствии с пунктом 4 настоящего Приложения);

д) для взятия смывов с каждой новой контрольной точки использовать отдельный зонд;

е) при взятии смывов с ламинарного шкафа первоначально открыть переднее стекло, взять смывы с дозаторов, оборудования, штативов для наконечников и пробирок, с рабочих поверхностей, затем с ручек и кнопок. Далее закрыть переднее стекло и включить ультрафиолетовое облучение;

ж) пробирки со смывами перенести в зону постановки ПЦР.

6. Порядок взятия смывов с каждой контрольной точки:

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

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

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

г) удалить зонд в контейнер для отходов.

7. ПЦР-исследование полученных смывов с контрольных точек проводится в обычном порядке по инструкции к набору реагентов, начиная с этапа амплификации ДНК. Для этого в пробирку, подготовленную к амплификации, вместо необходимого объема ДНК вносится жидкость образца смыва исследуемой контрольной точки. С целью экономии реагентов перед проведением ПЦР допустимо объединять в отдельной пробирке (пуллить) по 10 мкл образцы смывов с контрольных точек в одной зоне (например, в ламинарном шкафу, в ПЦР-боксе, с приборов для ПЦР и так далее) и затем исследовать как один образец. При получении положительных результатов какого-либо пула для уточнения источника контаминации необходимо исследовать отдельные точки, входившие в пул.

8. Все результаты проведения смывов с целью контроля контаминации лаборатории продуктами ПЦР регистрируются в специальном журнале.

9. Интерпретация результатов исследования смывов с контрольных точек.

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

Контрольные точки, в которых выявлены положительные результаты ПЦР, необходимо подвергнуть обработке веществами, деградирующими ДНК (препараты, содержащие активный хлор), с последующей экспозицией в течение 30 (тридцати) минут, тщательным удалением дезинфицирующего раствора водопроводной водой и облучением в ультрафиолетовом спектре.