

# ЛАБОРАТОРНЫЙ ДИАГНОЗ ХОЛЕРЫ

Методические указания  
«Лабораторная диагностика  
холеры» МУК 4.2.2218-07

# Цели бактериологического исследования

- 1. Выявление больных холерой и вибрионосителей.
- 2. Установление окончательного диагноза при вскрытии лиц, погибших от подозрительных на холеру заболеваний.
- 3. Бактериологический контроль за эффективностью лечения больных и вибрионосителей.
- 4. Обоснование этиотропной терапии.
- 5. Контроль за зараженностью внешней среды.
- 6. Контроль за эффективностью обеззараживания в очаге инфекции.

# Материал для исследования на холеру:

- МАТЕРИАЛ ОТ БОЛЬНОГО: испражнения, рвотные массы, желчь.
- ОРГАНЫ ТРУПА: отрезки тонкого и толстого кишечника, желчный пузырь, их содержимое.
- ОБЪЕКТЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ: предметы, загрязненные испражнениями больного, вода, ил, гидробионты, сточные воды, смывы с различных объектов, пищевые продукты и т. д.

# Природные резервуары холерного вибриона





# Транспортные среды:

- 1% ПВ рН 8,4;
- 1% ПВ рН 8,4 с теллуридом калия в конечном разведении 1:100000 или 1:200000;
- 2% р-р поваренной соли, разлитый в пробирки по 10 мл.

# Комплекс питательных сред

- жидкие среды обогащения
- щелочной агар
- элективные дифференциально-диагностические среды
- набор сред для идентификации холерных вибрионов



## Жидкие среды:

- 1% ПВ рН 8,3 (возможно рН 9,5 при отсутствии в лаборатории теллурита калия)
- 10% основной раствор пептона
- 1% ПВ с теллуридом калия в конечной концентрации 1:100000 или 1: 200000
- питательные бульоны рН 7,6 – 8,0 (Мартена, Хоттингера, МПБ, сердечно-мозговой)
- среда, приготовленная из кубиков бульона «Магги» (пропись РосНИПЧИ «Микроб»)

# Плотные питательные среды:

- Щелочной агар рН 7,6 – 8,0 – среда для выращивания холерных вибрионов;
- Дифференциально-диагностические среды:
- ТСBS, АЦДС, СЭДХ и др.;
- **Набор сред для идентификации (Хью-Лейфсона, ПУС, Гисса, Кристенсена и др.).** Используются наборы коммерческих ММТ и СИБ № 1;
- Применяют среды производственного выпуска, имеющие контрольный номер ОБТК, или среды, приготовленные по рецептуре и технологии, предусмотренной действующей инструкцией.

Плановые исследования на холеру ведутся по обычному графику работы лаборатории.

При подозрении на холеру и в очаге холеры лаборатории работают круглосуточно.

# Схема исследования на холеру материала от больного (испражнений и рвотных масс).

## 1 этап (0 часов).

- Бактериоскопия:
- - мазки с окраской холерными флюоресцирующими иммуноглобулинами O1 и O139;
- - по Граму.
- Посев в среду накопления – 50-100 мл 1% ПВ. Инкубация при T 37°C 5-6 часов.

- Посев на чашки ЩА – инкубация 12 – 16 часов.
- Посев на элективную среду типа TCBS – инкубация 18 – 24 часа.
- Экспресс-методы: РНГА, РИВ, ИФА, ПЦР.

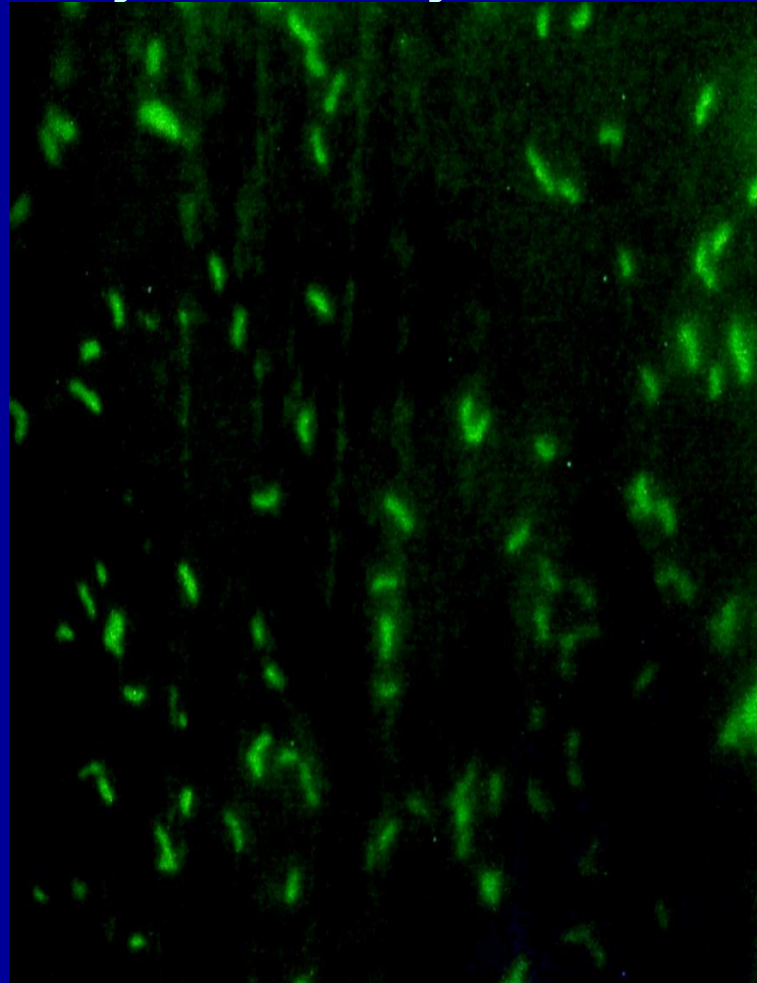
# Мазок из чистой культуры холерного вибриона с окраской по Граму



**Рис. 3.56.** Чистая культура *V. cholerae*. Окраска по Граму.

Вибрионы (от лат. *vibrio* — вибрировать) — прямые или изогнутые грамотрицательные палочки (0,3–1,3 x 1,4–5 мкм). Подвижны (монотрихи). Факультативные анаэробы. Оптимум роста при pH 8,5–9,0

Свечение клеток холерного вибриона,  
окрашенных холерными  
флюоресцирующими  
иммуноглобулинами.



## 2 ЭТАП (через 6 часов от начала анализа).

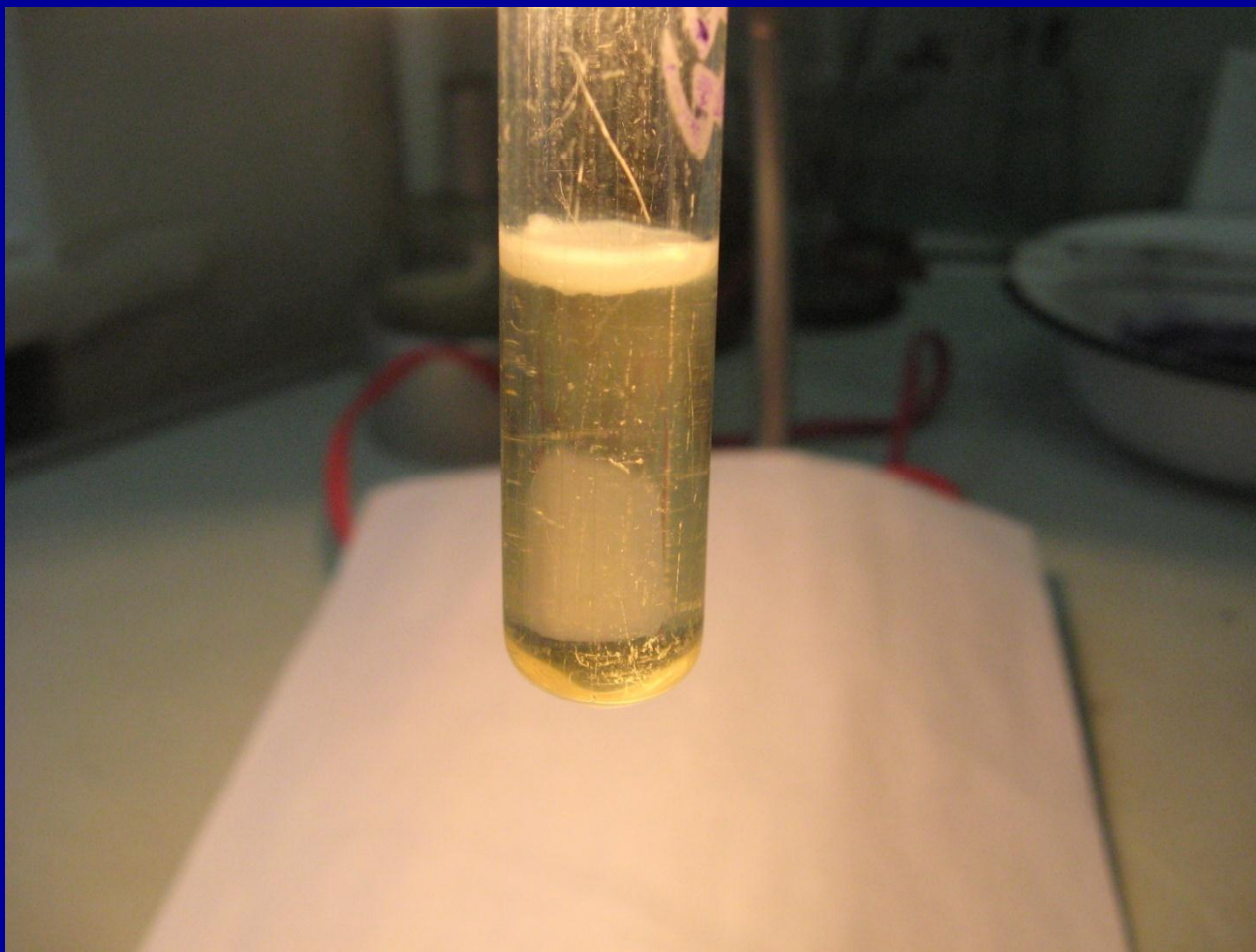
Работа с первой средой накопления (1-й ПВ):

- Высев на ЩА и ТСВС петлей № 5 (d 5 мм) и в две пробирки с 5 – 8 мл 1% ПВ (вторая среда накопления) с поверхностного слоя среды.
- Изучение подвижности возбудителя в препарате висячей или раздавленной капли.
- Постановка реакции иммобилизации вибрионов (РИВ) холерными сыворотками O1 или O139.

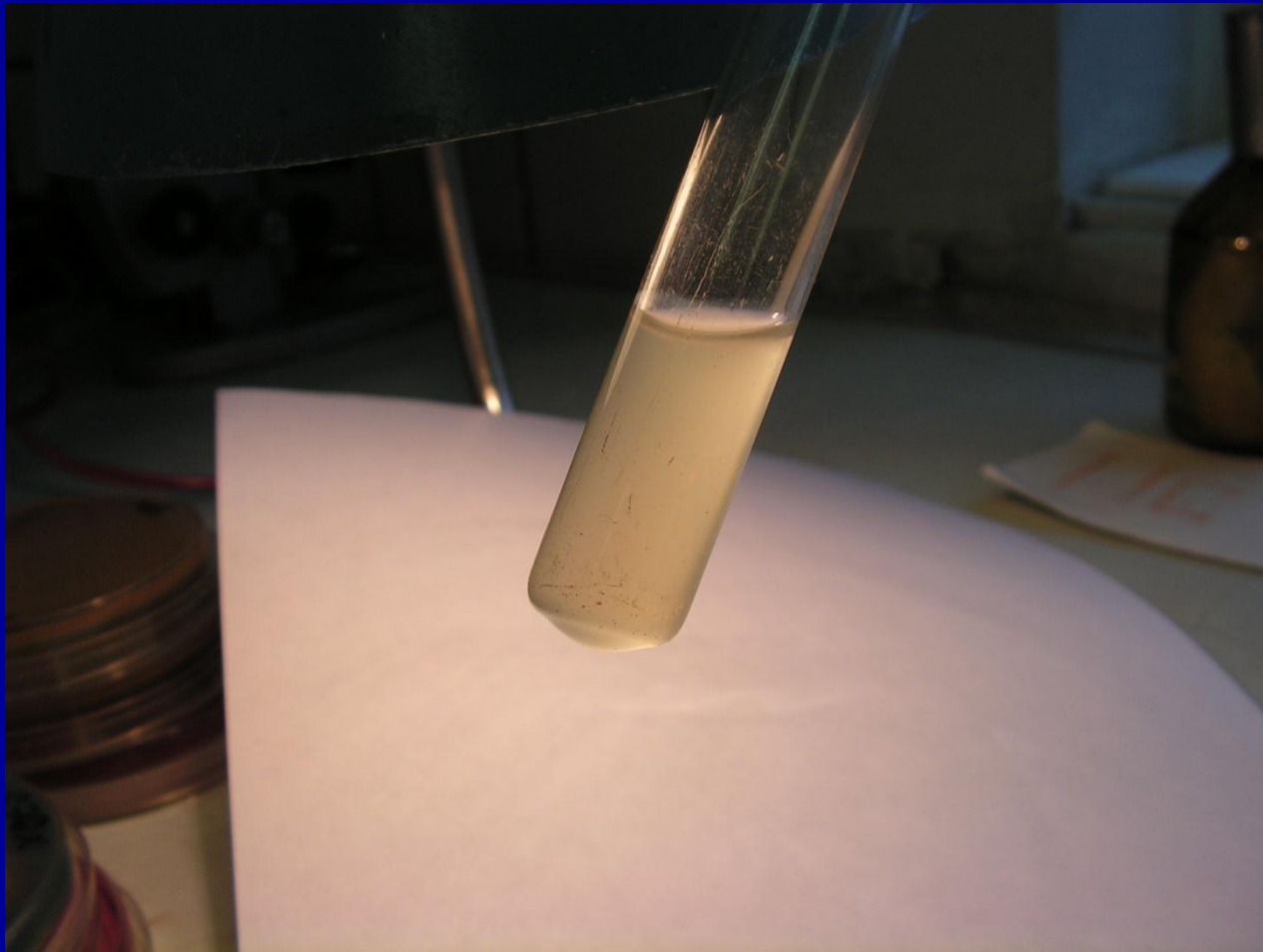


- Мазки по Граму и для МФА.
- Возможна постановка экспресс-методов при отрицательных результатах при исследовании нативного материала.

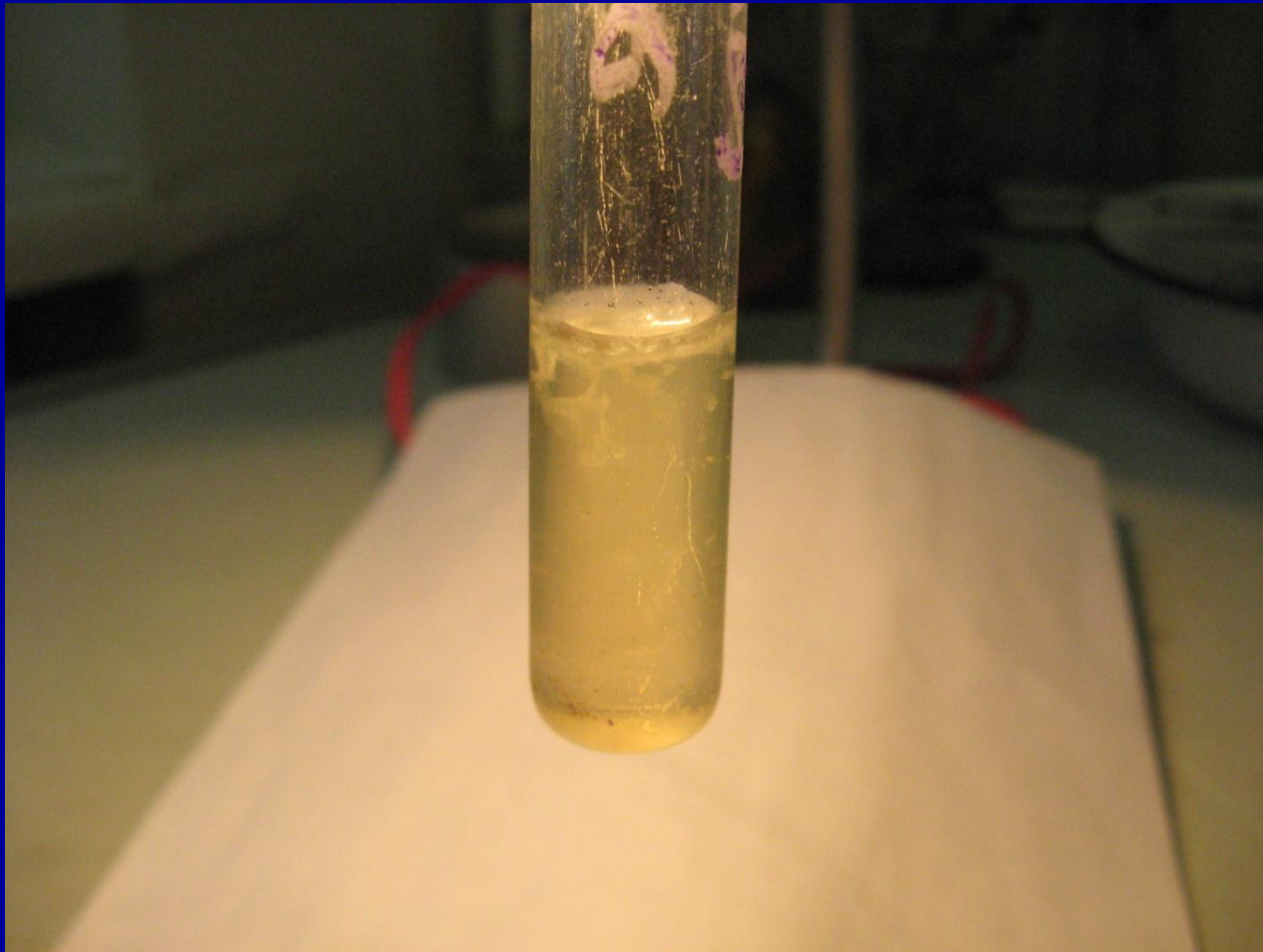
# Рост холерного вибриона в 1% пептонной воде (биовар эльтор)



# Рост холерного вибриона в жидкой среде (*V. cholerae* non O1/O139)



# Рост холерного вибриона O139 серогруппы в 1% П. В.

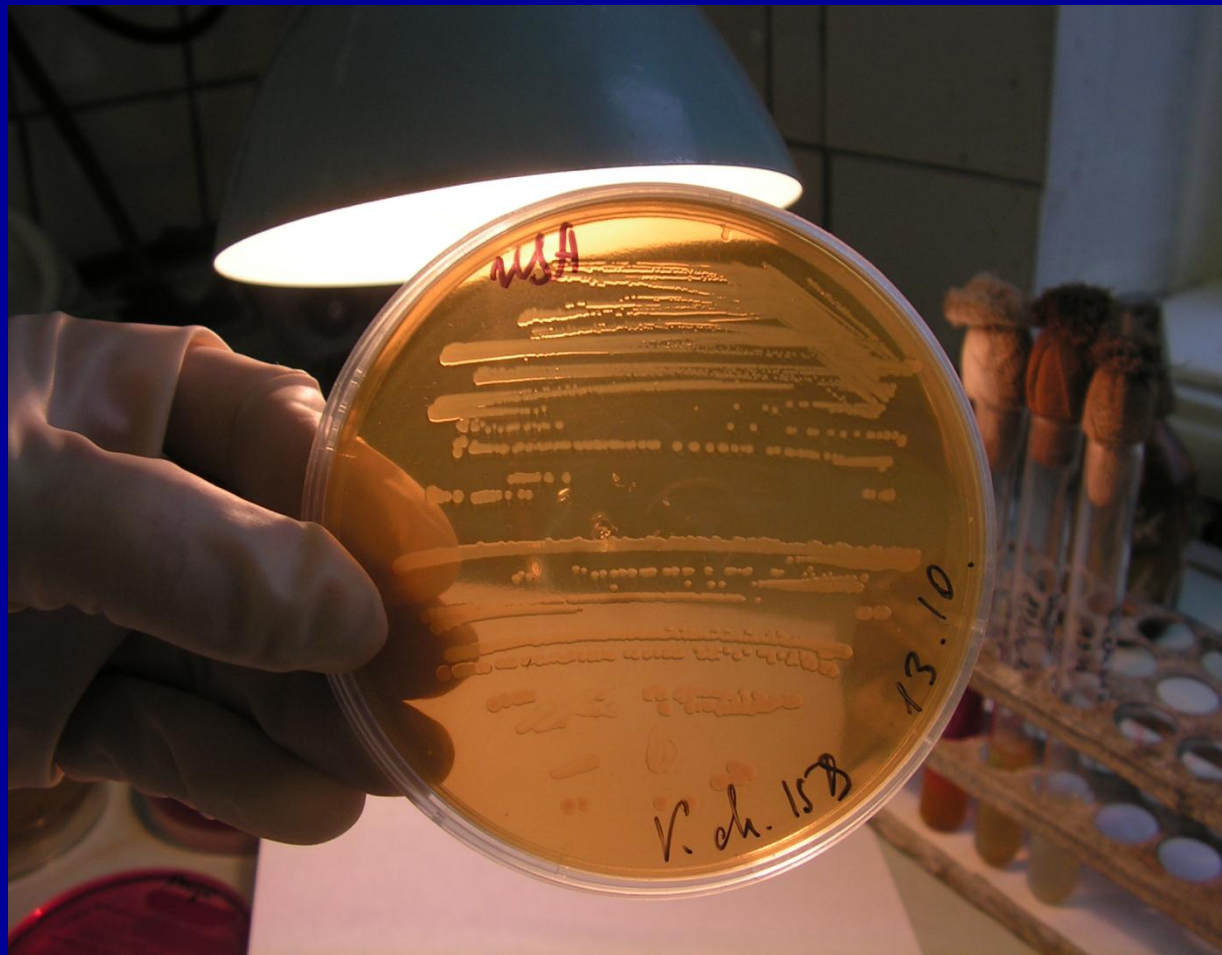


# 3 этап (через 12-16 часов)

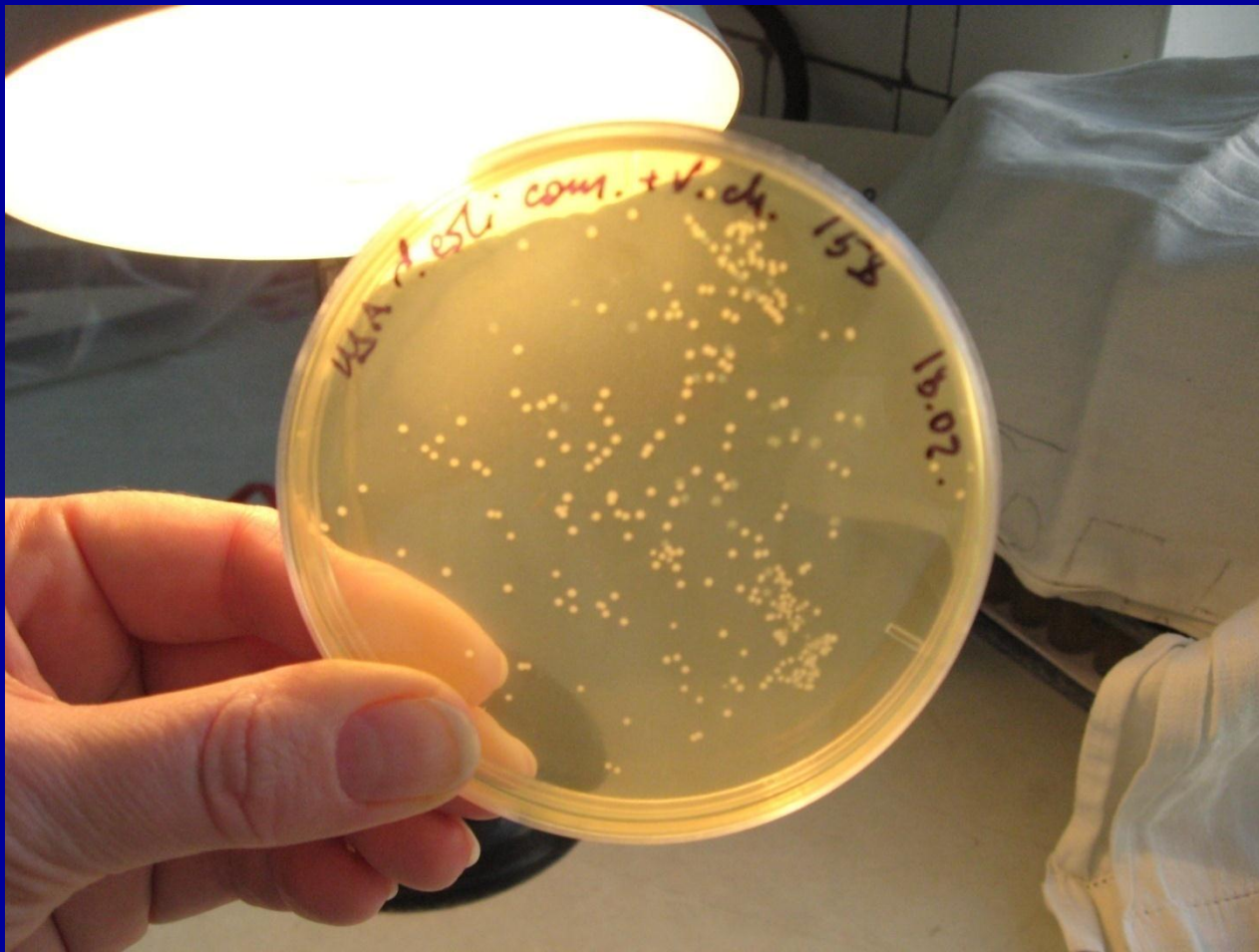
- Высев со 2-й среды накопления на ЩА.
- Отбор подозрительных на холерный вибрион колоний с чашек с посевами нативного материала.
- Проба на ИФО с культурой из подозрительных КЛ.
- Постановка слайд-агглютинации с холерными сыворотками О1 1:50-1:100 в ФР, вариантоспецифическими сыворотками Огава и Инаба 1:100; при отрицательных результатах – РА с сывороткой О139 1:50.

- Приготовление мазков из подозрительных колоний с окраской по Граму и холерными флюоресцирующими иммуноглобулинами O1 и O139.
- Пересев культуры из подозрительных на Х. В. КЛ ИФО+ на чашки ЩА для накопления культуры и на ПУС.

# Колонии холерного вибриона на щелочном агаре.



# Смесь колоний холерного вибриона и кишечной палочки на ЩА





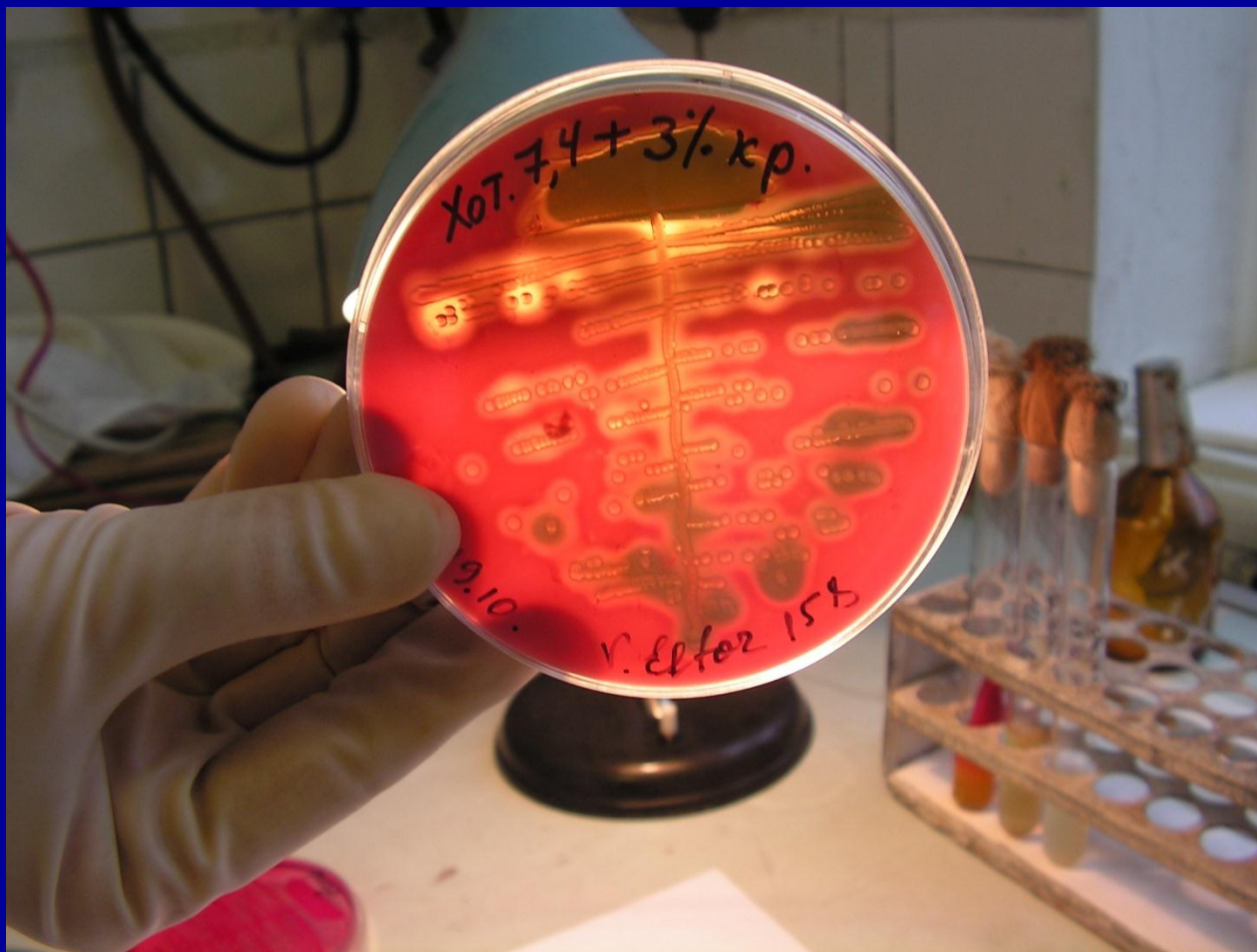
# Колонии холерного вибриона O139 серогруппы на ЩА



# Колонии холерного вибриона на среде TCBS



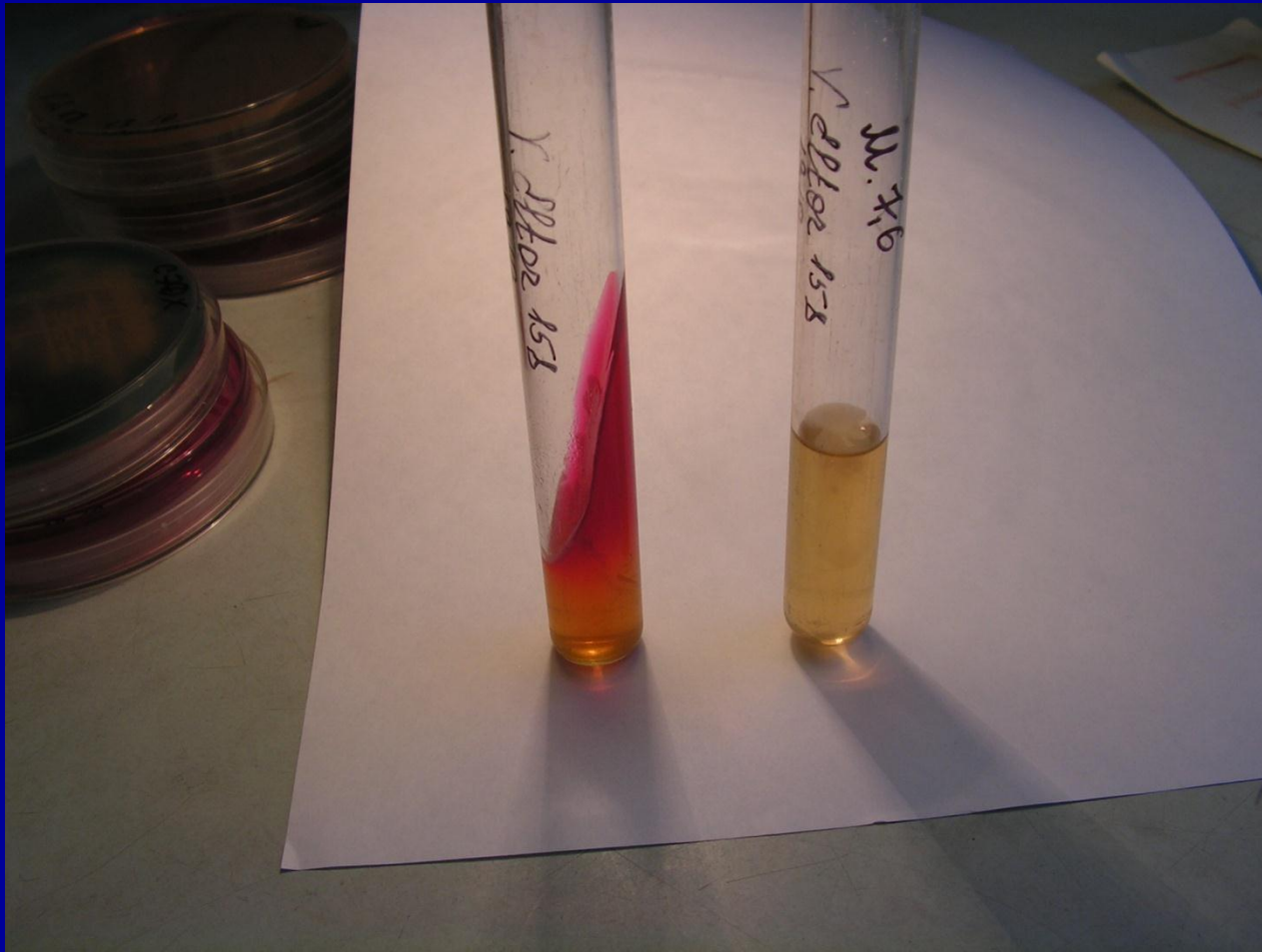
# Колонии холерного вибриона на кровяном агаре



# Колонии холерного вибриона на среде Эндо через 24 часа инкубации



# Рост холерного вибриона на среде Клиггера и в 0,3% п/жидком агаре



## 4 этап (через 24-36 часов).

- Отбор культур для идентификации.
- Идентификация выделенной культуры (постановка тестов).
- Определение ее эпидзначимости.
- Постановка пробы на чувствительность к антибиотикам методом серийных разведений.

## 5 этап (через 36-48 часов).

- Учет результатов проб на идентификацию.
- Выдача окончательного ответа о выделении культуры Х. В. соответствующей серогруппы и биовара.
- При выделении культуры Х. В. от больного или вибрионосителя, не агглютинирующейся холерными сыворотками О1 и О139, выдают ответ о выделении Х. В. не О1/О139 серогруппы. При наличии вибрионных агглютинирующих диагностических сывороток определяют принадлежность культуры к другим серогруппам.

## Идентификация культур холерного вибриона по сокращенной схеме

- Типичная морфология в мазках;
- Типичные культуральные свойства;
- Образование ИФО;
- Положительная слайд-агглютинация с холерными сыворотками O1 или O139;
- Изучение агглютинабельности культуры в развернутой РА с холерными сыворотками O1, Инаба, Огава и РО;
- Определение чувствительности к холерным б/фагам классическому и эльтор методом Грациа;



- Изучение биохимической активности: ферментации глюкозы в среде Хью-Лейфсона, сахарозы, маннозы, маннита и арабинозы, лизина, орнитина, аргинина на средах Гисса, СИБ или ММТ;
- Ориентировочная оценка эпидемической значимости по гемолитической активности в пробе Грейга и чувствительности к холерным фагам эльтор stx+ и stx-.



Возбудителями холеры являются: культуры оксидазо»+», активно подвижных вибрионов, расщепляющие глюкозу до кислоты без газа, декарбоксилирующие лизин и орнитин, не обладающие дегидролазой аргинина, ферментирующие сахарозу, маннозу, маннит и инактивные по отношению к арабинозе, агглютинирующиеся не менее чем до  $\frac{1}{2}$  титра сыворотками O1 и одной из вариантоспецифических.

Их относят к *V. cholerae* O1 серовара Инаба или Огава.

Культуры, агглютирующиеся обеими сыворотками не менее, чем до  $\frac{1}{2}$  титра (Огава и Инаба), относят к серовару Гикошима.

Для подтверждения принадлежности культуры холерных вибрионов к **O139-й серогруппе** достаточно положительного результата в слайд-агглютинации с сывороткой O139.

# Полная схема идентификации культуры холерного вибриона O1 серогруппы

предусматривает дополнительные тесты:

-определяющие принадлежность к биовару:

1. Изучение агглютинации эритроцитов куриных или морской свинки;
2. Чувствительности к полимиксину;
3. Продукции ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра.

- Изучение протеолитической и амилолитической активности;
- Определение антибиотикограммы методом серийных разведений;
- Окончательная оценка эпидзначимости по результатам исследования в ПЦР на наличие генов *ctxAB* и *tcrA* и определение токсигенности на модели кроликов-сосунков.

При выделении культур *V. cholerae* O139 их изучают теми же методами, кроме пробы с фагами *ctx*.

**Идентификацию атипичных культур, имеющих признаки холерных вибрионов, ИФО +, но не агглютинирующихся сыворотками O1 и O139 серогрупп, выделенных от больных ОКИ, проводят по тестам, определяющим принадлежность к роду *Vibrio* и виду *V. cholerae*.**

# Тесты принадлежности к роду *Vibrio*

- Тип расщепления глюкозы в среде Хью-Лейфсона (O/F тест);
- Определение декарбоксилазы лизина и орнитина и дегидролазы аргинина (среды Меллера, Фалькоу, СИБ);
- Уреазная активность (среда Кристенсена);

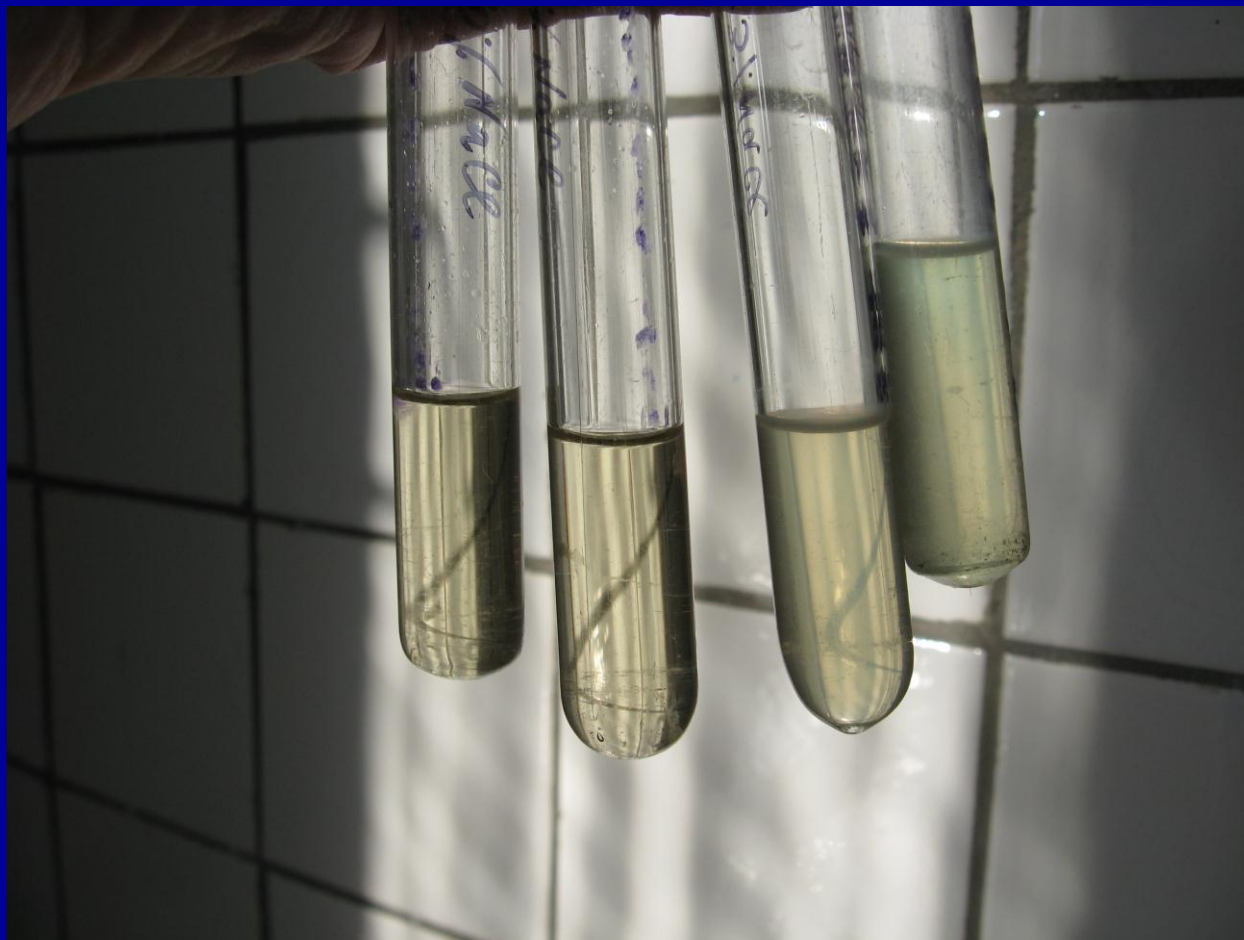


- Индолообразование;
- Продукция сероводорода;
- Ферментация лактозы, маннита, арабинозы, сахарозы, инозита;
- Образование ацетилметилкарбенола;
- Протеолитическая активность (желатиназа);
- Продукция  $\beta$ -галактозидазы.

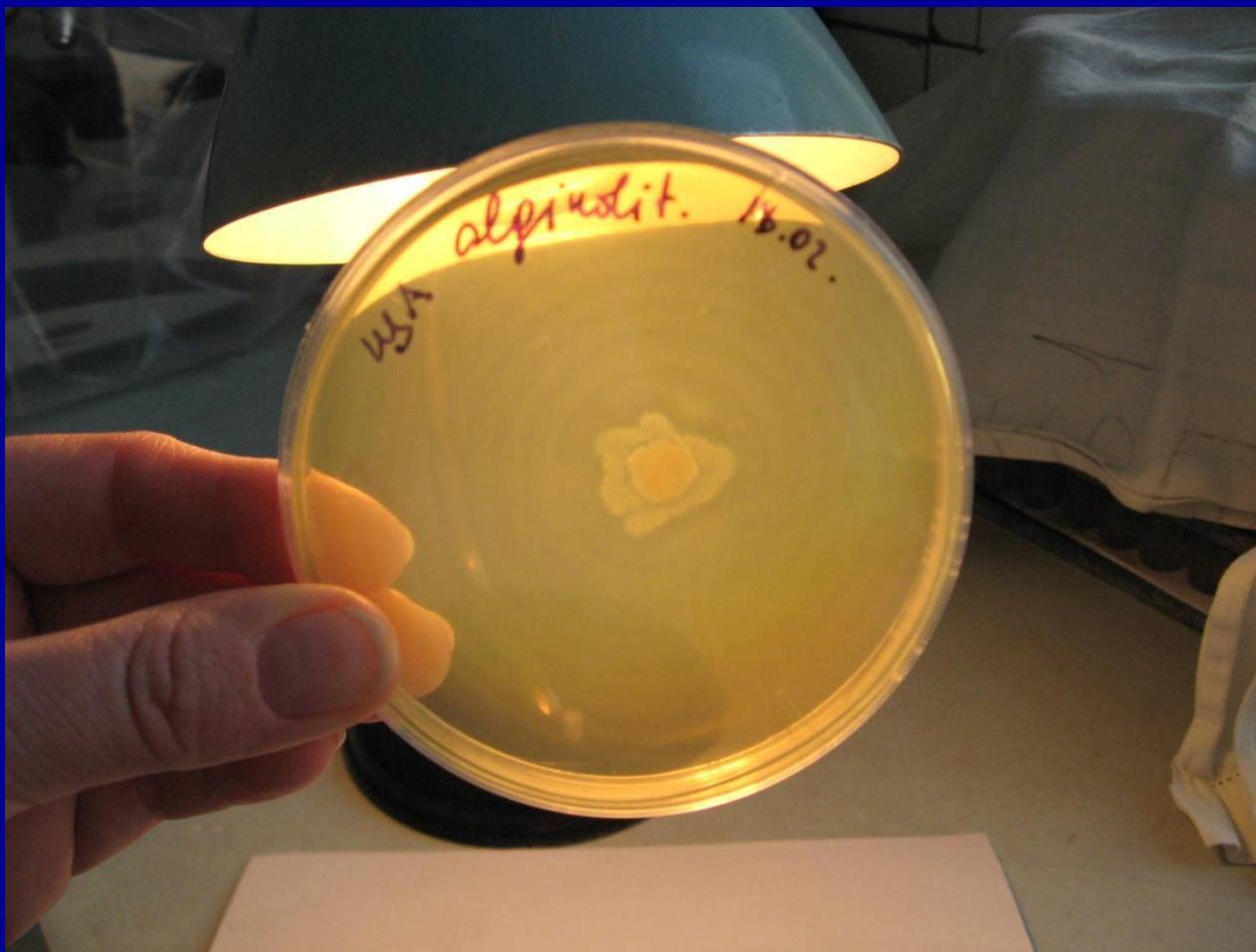
# Внутривидовые отличия:

- Рост в 1% ПВ с различными концентрациями NaCl (0%, 3%, 6%, 10%);
- Способность к роению (*V. alginolitycus*);
- Биолюминесценция (*V. albensis*);
- И другие.

Рис.12. Рост холерного вибриона в 1% пептонной воде с различной концентрацией поваренной соли (слева направо: 10%, 7%, 3%, 0,1%).



# Феномен роения *V. alginolyticus*



# Исследование секционного материала

- Посев содержимого кишечника и желчного пузыря, суспензии кусочков слизистой оболочки тонкой кишки в объеме 0,5 – 1 мл пипеткой в 50 – 100 мл 1% ПВ;
- Посев петлей на ЩА и ТСВС.

# Исследование воды

Отличается только на 1-м этапе.

- Пептонизация пробы воды до получения 1% р-ра пептона добавлением 10% основного р-ра пептона.
- При необходимости - подщелачивание пробы воды 10% водным р-ром NaOH до pH 8,0.
- Инкубация при T 37°C 8 часов.
- Для продления срока инкубации - добавление теллурита калия до конечной концентрации 1:100000 или 1:200000.

# Методы определения эпидемической значимости холерных вибрионов

- 1. По сопутствующим вирулентности фенотипическим признакам;
- 2. Биологический метод *in vivo*;
- 3. Молекулярно-генетические методы.

1. Известно, что  $ctx^+$  холерные вибрионы не лизируют эритроциты –  $Hly^-$ ; и наоборот:  $ctx^- Hly^+$ .

Изучается гемолитическая активность культуры в пробе Грейга с использованием 1% взвеси эритроцитов барана в ФР.



# Определение эпидзначимости холерных вибрионов эльтор комплексным методом.

Сочетание 2-х методов:

- определение чувствительности культуры к б/фагам stx+ и stx-;
- Определение гемолитической активности в пробе Грейга.

## 2. Биологический метод.

- Определение токсигенности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков.

Используют две заражающие дозы:  
100000 и 100000000,

вводят в/кишечно в объеме 0,2 мл 2-м кроликам. Наблюдение 48 часов. При вскрытии оценивают патологоанатомическую картину.

- Токсигенные штаммы вызывают гибель животных в течение 2-х суток с образованием «синдрома холерогенности». Они содержат ген холерного токсина и являются эпидемически опасными.
- Энтеропатогенные штаммы вызывают иную картину, не имеют ген *ctx AB* и продуцируют другой диареегенный токсин.
- Атоксигенные штаммы не вызывают заболевания, гибели животных и макроскопических изменений в кишечнике.

Обязательному определению токсигенности на модели кроликов-сосунков подлежат следующие штаммы холерного вибриона O1 и O139 серогрупп:

- **Выделенные от людей:**

- гемолиз »-» O139;

- гемолиз »+» O1 и O139;

- гемолиз »-» O1, атипичные по серологическим свойствам и устойчивые к фагу эльтор и stx+.

- **Выделенные из объектов окружающей среды:**

- гемолиз «-» O1 и O139 при отсутствии эпидосложнений по холере.

# 3. Молекулярно-генетические методы:

- Метод молекулярного зондирования;
- ПЦР со специфическими праймерами.

Определяется наличие генов *ctxAB* и  
*tcrA*.

