

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ХОЛЕРУ

МИРОНОВА Л.В.

д.м.н., зам. директора по лабораторно-
диагностической работе ФКУЗ Иркутский
научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора



ЦЕЛИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

- выявление больных холерой и вибрионосителей;
- установление окончательного диагноза при вскрытии трупов лиц, умерших от подозрительного на холеру заболевания;
- обоснование объема профилактических и противоэпидемических мероприятий и тактики работы в очаге холеры;
- обоснование выбора средств этиотропной терапии холеры;
- бактериологический контроль эффективности лечения больных холерой и вибрионосителей;
- мониторинг вибриофлоры объектов окружающей среды.

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ, РЕГЛАМЕНТИРУЮЩИЕ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ

- **СанПиН 3.3686-21** «САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ ПО ПРОФИЛАКТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ»
- **МУК 4.2.3745-22** МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

3

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



А.Ю. Попова
2022 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

Методические указания
МУК 4.2.3745-22

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) определяют методы диагностических и профилактических исследований на выявление возбудителя холеры в соответствии с порядком организации и проведения лабораторной диагностики холеры, установленным санитарно-эпидемиологическими требованиями¹, а также методическими указаниями².

¹ Глава XXV СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный № 62500) (далее – СанПиН 3.3686-21).

² МУК 4.2.3746-22 «Организация и проведение лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного уровня», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 12.05.2022 (далее – МУК 4.2.3746-22).

Методы лабораторной диагностики холеры. МУК 4.2.3745-22

1. Разработаны: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (А.К. Носков, В.Д. Кругликов, О.С. Чемисова, Э.А. Москвитина, Е.В. Монахова, Н.Е. Гаевская, А.Б. Мазрухо, Н.А. Селянская, Л.П. Алексеева, О.А. Подойницына, А.С. Водопьянов, Д.А. Левченко, М.И. Ежова); ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Е.С. Казакова, Н.А. Осина, И.Н. Шарова, А.С. Абдрашитова, Н.Е. Щербакова, С.А. Щербакова, В.В. Кутырев); ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (В.П. Смелянский, И.Б. Захарова, Г.А. Ткаченко, М.В. Подшивалова); ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (С.В. Балахонов, Л.В. Миронова, Л.Я. Урбанович, Ж.Ю. Хунхеева, А.С. Гладких, Е.А. Басов, А.С. Пономарева); ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (В.Н. Савельев, И.В. Савельева); ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора (А.А. Лопатин, С.М. Иванова, В.В. Иванников); ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (М.В. Зароченцев, В.В. Мордвинова, М.А. Ярославцева); ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (И.А. Дятлов, М.В. Храмов, Е.А. Тюрин, Л.В. Чекан, С.Ф. Бикетов, Е.В. Баранова, П.В. Соловьев, И.Ю. Щит); ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (Ю.В. Олефир, Л.В. Саяпина, В.А. Меркулов, В.П. Бондарев).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой *12 мая* 2022 г.

3. МУК 4.2.3745-22 введены взамен МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 31.05.2007, с изменениями, внесенными МУК 4.2.2315-08 «Серологические методы в диагностике холеры», утвержденными руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18.01.2008.

МУК 4.2.3746 -22 ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ В ЛАБОРАТОРИЯХ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ

УТВЕРЖДАЮ

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



А.Ю. Попова

«12» мая 2022 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ В ЛАБОРАТОРИЯХ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ

Методические указания
МУК 4.2.3746-22

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) определяют порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий микробиологического профиля территориального, регионального и федерального уровней¹ в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями² и методическими указаниями³.

¹ Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» (далее – приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116).

² Глава XXV СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный № 62500) (далее – СанПиН 3.3686-21).

³ МУК 4.2.3745-22 «Методы лабораторной диагностики холеры», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 12.05.2022 (далее – МУК 4.2.3745-22).

2

Организация и проведение лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного уровня. МУК 4.2.3746-22

1. Разработаны ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (А.К. Носков, В.Д. Кругликов, О.С. Чемисова, Э.А. Москвитина, А.Б. Мазрухо, А.С. Водопьянов, Н.Е. Гаевская, Е.В. Монахова, Н.Л. Пичурина, Е.Г. Соболева, Д.А. Левченко, М.И. Ежова, О.А. Подойницына,); ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (В.В. Кутырев, Е.С. Казакова, Н.А. Осина, И.Н. Шарова, А.С. Абдрашитова, Н.Е. Щербакова, С.А. Щербакова); ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (Л.В. Миронова, Ж.Ю. Хунхеева, Е.А. Басов, А.С. Пономарева, Н.О. Бочалгин, И.С. Федотова, А.В. Фортунатова, С.В. Балахонов); ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (О.И. Малецкая, В.Н. Савельев, И.В. Савельева, Т.В. Таран); ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора (А.А. Лопатин, С.М. Иванова, В.В. Иванников); ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (М.В. Зароченцев, В.В. Мордвинова, М.А. Ярославцева); ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (И.А. Дятлов, М.В. Храмов, А.Г. Шевякова, Е.А. Тюрина); ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (Ю.В. Олефир, Л.В. Саяпина, В.П. Бондарев, В.А. Меркулов).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой «12» мая 2022 г.

3. МУК 4.2.3746-22 введены взамен МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 25.05.2011.

- **ПРИКАЗ ОТ 01.12.2017 № 1116 О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации**

ТРЕХУРОВНЕВАЯ СИСТЕМА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ В РФ

ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ

РЕГИОНАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ

ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ

- бактериологические лаборатории МО, ФБУЗ «ЦГиЭ» и его филиалов, имеющие разрешение на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей **III-IV групп патогенности** (опасности)
- лаборатории ФБУЗ «ЦГиЭ» и обособленных структурных подразделений, независимо от ведомственной подчиненности, имеющие разрешение на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей **II-IV групп патогенности** (опасности)

ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ: бактериологические лаборатории, имеющие разрешение на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей **III-IV групп патогенности (опасности)**

НОМЕНКЛАТУРА ИССЛЕДОВАНИЙ

— плановые диагностические исследования материала от больных ОКИ в соответствии с тактикой эпидемиологического надзора за холерой

— профилактические исследования на холеру, в том числе на вибриононосительство, материала от декретированных групп населения и лиц, подлежащих обследованию

— плановые профилактические исследования проб из объектов окружающей среды осуществляют лаборатории ЦГиЭ и его филиалов

ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЙ:

- 1) **Посев на питательные среды накопления** (1% пептонная вода, приготовленная из основного раствора пептона), дифференциально-диагностическую среду (TCBS), среду для выделения и культивирования холерного вибриона (щелочной агар). Исследования ведут до установления отрицательного результата анализа или до выделения культуры с характерным для вибрионов ростом на агаровой среде и ее идентификации;
- 2) **Идентификация культуры**, подозрительной на холерный вибрион, по следующим тестам:
 - ферментация на полиуглеводной среде;
 - определение индофенолоксидазы;
 - микроскопия мазка, окрашенного по Грамму;
 - слайд-агглютинация с сыворотками диагностическими холерными.
- 3) **Экспресс и ускоренная диагностика: метод МФА, РИВ, ИХА.**

ПОРЯДОК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С УЧРЕЖДЕНИЯМИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Все изолированные от людей культуры, подозрительные на холерные вибрионы, независимо от результатов слайд-агглютинации холерными сыворотками, передаются для дальнейшей идентификации в установленном порядке !!!

Культуры холерных вибрионов направляют в лаборатории ООИ ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии" в субъекте, при ее отсутствии в лабораторию Центра индикации и диагностики опасных инфекционных болезней. Передачу и транспортирование осуществляют в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ: микробиологические лаборатории, имеющие разрешение на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей II-IV групп патогенности (опасности)

НОМЕНКЛАТУРА ИССЛЕДОВАНИЙ

- диагностические исследования материала от больных и умерших с подозрением на холеру, а также секционный материал от умерших, причиной смерти которых явились кишечные инфекции неустановленной этиологии;
- диагностические исследования материала от больных ОКИ и определенного контингента здоровых лиц, подлежащих обследованию на холеру в соответствии с тактикой эпидемиологического надзора за холерой;
- диагностические исследования проб из объектов окружающей среды дифференцированно, с учетом типов территорий по эпидемическим проявлениям холеры.
- идентификацию культур холерных вибрионов с определением эпидемической значимости в ПЦР по наличию генов *ctxA* и *tcpA*.
- контроль качества питательных сред лабораторий филиалов ЦГиЭ

ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЙ:

- идентификация культур, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, а также культур, поступивших из МО и филиалов ЦГиЭ, производится по схеме, дополнительно включающей:
 - определение принадлежности к *V. cholerae*:
 - определение типа расщепления глюкозы (тест Хью-Лейфсона);
 - определение ферментации углеводов и многоатомных спиртов;
 - определение декарбоксилазной и дигидролазной активности по отношению к аминокислотам (аргинин, лизин, орнитин);
 - МФА, ПЦР;
 - определение биоварианта холерных вибрионов O1:
 - чувствительность к фагам диагностическим классическому и эльтор, реакция Фогес-Проскауэра, ПЦР;
 - определение серогруппы и сероварианта:
 - ИХ-тест на определение O1 серогруппы;
 - постановка развернутой РА с холерными диагностическими сыворотками O1, Инаба, Огава, RO и реакции слайд-агглютинации с холерной диагностической сывороткой O139 серогруппы;
- оценка эпидемической опасности культур:
 - определение гемолитической активности;
 - постановка ПЦР (на наличие генов *ctxA* и *tcpA*);
- определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом;
- контроль качества плотных и жидких питательных сред с использованием нетоксигенного тест-штамма холерного вибриона неO1/неO139 серогруппы № P-9741.

РЕГИОНАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ: микробиологические лаборатории

Центров индикации, имеющие разрешение на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей I-II групп патогенности (опасности)

Номенклатура.

- идентификация культур холерных вибрионов, выделенных/ подтвержденных в лабораториях территориального уровня;
- серологическое обследование больных холерой, вибриононосителей и других контингентов населения – по эпидемиологическим показаниям;
- проверка качества питательных сред для лабораторной диагностики холеры и ингибиторов посторонней микрофлоры;
- диагностические исследования на холеру, предусмотренные для бактериологических лабораторий территориального уровня.

Объем.

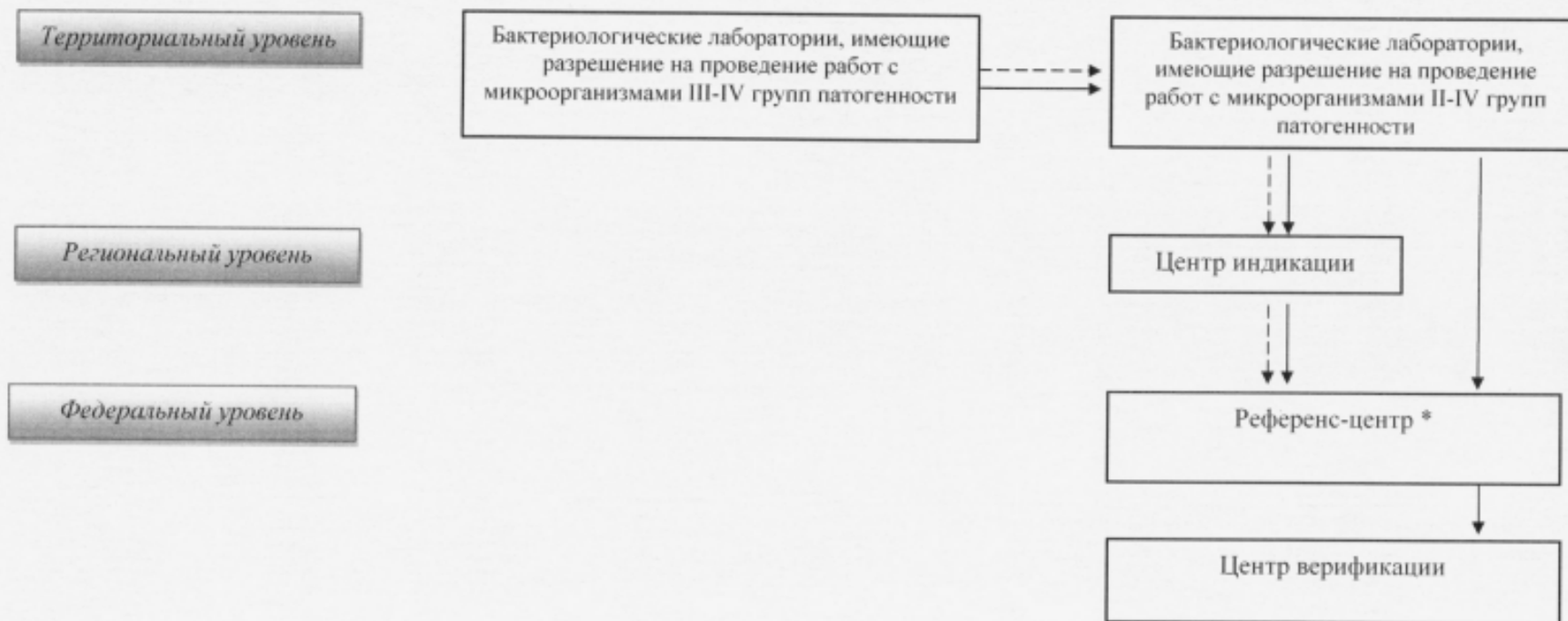
- диагностические исследования;
- идентификация культур холерных вибрионов, выделенных/подтвержденных в лабораториях территориального уровня;
- определение чувствительности холерных вибрионов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений;
- оперативное генотипирование выделенных культур при наличии соответствующего оснащения;
- серологическая диагностика холеры;
- проверка качества ингибиторов сопутствующей микрофлоры.

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ: лаборатории **Референс-центра** и **Центров верификации**, имеющие разрешение на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей **I-II групп патогенности** (опасности)

Референс-центр – Ростовский-на-Дону НИПЧИ

Национальный Центр верификации диагностической деятельности – РосНИПЧИ «Микроб»:

- расширенная идентификация и молекулярное типирование возбудителя холеры, в том числе штаммов с атипичными свойствами и вновь выявленных, явившихся причиной эпидемической вспышки, с определением антибиотикочувствительности, изучением механизмов антибиотикорезистентности.

Схема передачи выделенных культур *V. cholerae* O1, O139 для идентификации в учреждениях различного уровня

Примечания:

- > – токсигенные штаммы *V. cholerae* O1, O139;
 - - - - -> – нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1, O139;

* – срок поступления на идентификацию в Референс-центр нетоксигенных культур *V. cholerae* O1, O139 – не позднее 1 месяца;
 срок поступления в Референс-центр на идентификацию токсигенных культур – не позднее 5 суток.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

ТРАНСПОРТНЫЕ СРЕДЫ

1 % пептонная вода,

1 % пептонная вода с теллуридом калия

- рН 1% пептонной воды 8,5 +/- 0,1, срок хранения в герметичной упаковке (резиновые пробки и металлические колпачки) - 2 месяца

- теллурид калия добавляют после автоклавирования пептонной воды в конечном разведении 1:100000 или 1:200000. Рабочий 0,1 % раствор теллурида калия (1:1000) - срок хранения рабочих растворов 7 дней, 1 % пептонной воды с теллуридом калия – 2 сут в холодильнике.

СРЕДЫ ОБОГАЩЕНИЯ

1% пептонная вода,

1% пептонная вода с теллуридом калия

ПЛОТНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ЩЕЛОЧНЫЕ

-Агар для культивирования холерного вибриона,

- TCBS – Тиосульфат-цитратный агар с сахарозой

-и желчью

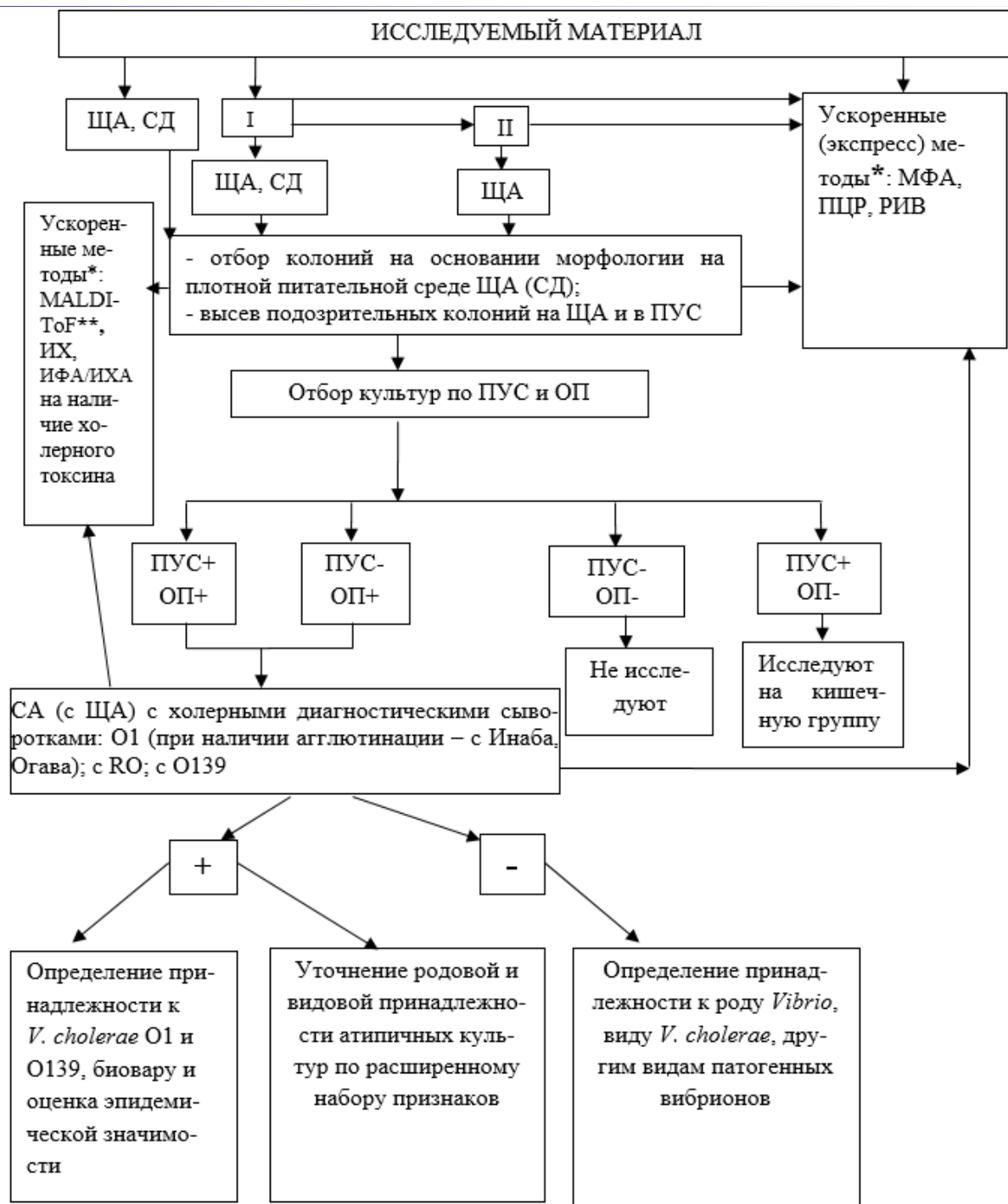
СРЕДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ

полиуглеводные среды, среды с аминокислотами, сахарами и многоатомными спиртами и др.

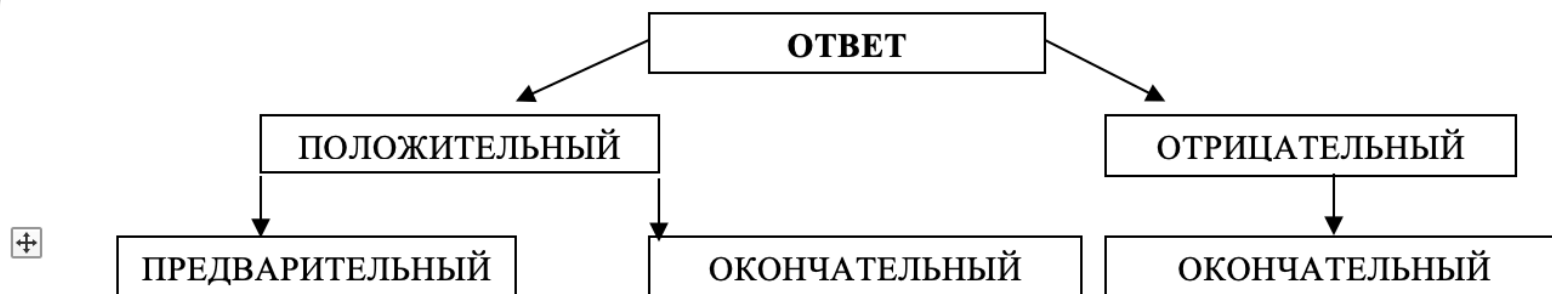
**! ОБЯЗАТЕЛЬНАЯ ПРОВЕРКА КАЧЕСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ
СРЕД И ИНГИБИТОРОВ РОСТА**



СХЕМА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА



СРОКИ И ОСНОВАНИЯ ВЫДАЧИ ОТВЕТА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ



Сообщается устно в случаях проведения срочных исследований по результатам ускоренного исследования нативного материала, после подрачивания в 1% пептонной воде (МФА, ПЦР), по результатам: слайд-агглютинации подозрительных колоний с сыворотками холерными O1 (при наличии агглютинации с O1 – с Инаба, Огава), с RO и с O139; масс-спектрометрической идентификации после экстракции белка (при наличии масс-спектрометра), ИХ; ИФА/ИХА – на холерный токсин

Сообщается письменно по результатам идентификации выделенной культуры с указанием антибиотикограммы и эпидемической значимости

**36-48 часов
от начала
исследования***

Сообщается письменно по окончании исследования по схеме.

Не допускается выдавать отрицательный ответ по результатам ускоренного исследования

**36-48 часов
от начала
исследования***

** При осуществлении эпидемиологического надзора в условиях односменной работы лаборатории, допускающей использование теллурита калия, продолжительность анализа увеличивается до 3-4 суток*