

Изобретение относится к медицине, а именно к инфекционным болезням и эпидемиологии.

Известен способ морфологической идентификации возбудителя дифтерии по их принадлежности к различным биохимическим вариантам путем исследования морфологии колоний микроорганизмов и их микроскопии (Титова А.И., Флексер С.Я. Дифтерия. - М., 1967).

Недостатками этого способа являются длительность выполнения, а также невысокая специфичность из-за значительного полиморфизма микроорганизмов.

Известен также способ-прототип бактериологической диагностики и идентификации возбудителей дифтерии, заключающийся в посеве полученного от пациента материала на питательные среды с последующим определением токсигенных и ферментативных свойств возбудителя при помощи специальных питательных сред и его идентификацией по принадлежности к биохимическим вариантам Gravis, Mitis или Intermedius (Методические указания к Приказу МЗ СССР №45 от 02.04.86).

Идентификация возбудителей дифтерии указанным способом выполняется следующим образом.

1. Забор материала от пациентов производится с помощью сухих стерильных ватных тампонов со слизистой зева, миндалин и носа на границе здоровой и пораженной тканей.

2. Материал засеивается на чашки с питательными средами, например, на кровяно-теллуритовый агар, после чего чашки помещаются в термостат (36°C) на 24 часа.

3. При наличии подозрительных колоний производится посев на среду для определения токсигенности, среду Пизу (тест на цистиназу), а также на скошенный сывороточный агар для выделения чистой культуры. Все посевы, а также чашки с первичным посевом помещаются в термостат.

4. Через 24 часа производится повторный просмотр чашек с первичным посевом и учет результатов тестов на токсигенность и цистиназу. При положительных результатах этих исследований выдается ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии. При отрицательных результатах чашки помещаются в термостат еще на 24 часа.

5. Выделенная на сывороточном агаре чистая культура рассеивается на специальные среды для определения биохимических свойств: сахаролитических (сбраживание сахарозы, глюкозы, крахмала) и наличия фермента уреазы (расщепление мочевины). Чашки с посевами помещаются в термостат.

6. Через 24 часа производится повторный просмотр чашек с посевами для определения токсигенности и цистиназной активности, а также учет результатов определения биохимических свойств. В зависимости от результатов этих исследований, а также по морфологии колоний выдают ответ о выделении культуры *Corinebacterium diphtheriae* var. Gravis, var. Mitis или var. Intermedius.

Таким образом, на выделение и идентификацию возбудителей дифтерии бактериологическим методом затрачивается от 48 до 72 часов.

Недостатками прототипа являются:

1. Недостаточная точность определения таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов, связанная с нестандартностью применяемых питательных сред, значительной морфологической, биохимической и генетической изменчивостью возбудителя дифтерии (Дифтерийная инфекция / Философов Т.Г., Мошчиц П.С., Мельник М.Н., Богатырева С.А. - К., 1984; Крылова М.Д. Дифтерийная инфекция. - М., 1976).

2. Большая длительность выполнения процедуры выделения и идентификации возбудителей дифтерии (Крылова М.Д., 1976; Турьянов М.Х. Особенности клиники и эпидемиологии дифтерии на современном этапе // Сов. медицина. - 1991. - №1. - С.75 - 77).

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа идентификации возбудителя дифтерии по принадлежности к тому или иному биохимическому варианту, в котором за счет применения полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами возможно повышение точности идентификации микроорганизмов и сокращение затрат времени и труда, что позволит улучшить качество и увеличить скорость диагностики и эпидемиологических исследований.

Поставленная задача решается тем, что в способе таксономической видоидентификации возбудителей дифтерии путем забора ротоглоточного смыва пациента, посева на чашки с питательными средами, согласно изобретению, подозрительные колонии после 24 - 48 часового роста помещаются в раствор этилового спирта, с дальнейшим лизированием клеточной стенки микроорганизмов, осаждением бактериальной ДНК и амплификацией фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами и термостабильной ДНК-полимеразой Tth, после чего осуществляется электрофорез продуктов амплификации в агарозном геле и сопоставление полученных картин амплификации с картиной амплификации контрольных штаммов.

Заявляемый способ идентификации возбудителей дифтерии основан на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными праймерами, отжигающимися на определенных участках генома идентифицируемого организма, что позволяет с большой точностью определить принадлежность исследуемого организма к биохимическим вариантам Gravis, Mitis и Intermedius.

Сущность изобретения заключается в следующем.

1. Забор материала от пациентов производится с помощью сухих стерильных ватных тампонов со слизистой зева, миндалин и носа на границе здоровой и пораженной тканей.

2. Материал засеивается на чашки с питательными средами, например, на кровяно-теллуритовый агар, после чего чашки помещаются в термостат (36°C) на 24 часа.

3. При наличии подозрительных колоний последние снимаются петлей и переносятся в пробирки с 50% - ным этиловым спиртом.

4. Пробирки центрифугируются при 8000об/мин в течение 15мин, осадок ресуспендируется в 180мкл стерильной воды.

5. Производится щелочной лизис пробы, для чего к суспензии добавляется 2,8мкл 16,5М раствора NaOH и 40мкл 2М раствора трис-HCl, pH - 8,0.

6. Пробирку с материалом центрифугируют в течение 3мин при 8000об/мин и отбирают супернатант.

7. Производят амплификацию в течение 35 циклов. В качестве праймера используются универсальные олигонуклеотиды, комплементарные высококонсервативным последовательностям в геноме исследуемых микроорганизмов.

8. Продукты амплификации исследуют с помощью электрофореза в 1,8% - ном агарозном геле. На отдельные дорожки наносят, маркеры молекулярного веса и продукты амплификации контрольных (музейных) штаммов коринебактерий дифтерии var. Gravis, Mitis, Intermedius токсигенных и нетоксигенных.

9. Гель фотографируют и проводят сопоставление полученных паттернов с контрольными, на основании чего

делают вывод о принадлежности исследуемых штаммов к тому или иному биохимическому варианту.

Заявляемая совокупность признаков позволит увеличить скорость диагностики и экспериментальных исследований, повысить точность идентификации микроорганизмов за счет применения полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами.

Приводим пример конкретного выполнения заявляемого способа.

Больной К., 17 лет, поступил в инфекционную больницу в связи с выделением коринебактерий дифтерии. Мазки для бак. исследования были взяты в поликлинике, куда больной обратился по поводу незначительного повышения температуры, боли в горле и недомогания. Дома получал антибактериальную терапию.

При поступлении состояние средней тяжести, отмечалась гиперемия слизистой ротоглотки, гипертрофия миндалин 2 - 3 степени. Миндалины рыхлые, рельефны, налетов не было.

Больному был назначен курс антибактериальной терапии, состояние значительно улучшилось.

Результаты лабораторных исследований:

ЭКГ - выраженные изменения миокарда, нарушения проводимости по правой ножке пучка Гиса.

Реакция прямой гемагглютинации (РПГА) 1 - 1 : 80, РИГА 2 - 1 : 320.

При бактериологическом исследовании мазков, полученных при поступлении в больницу, выделены *Cor.diphtheriae* var.*Mitis* нетоксигенные.

Заключение ЛОР-врача: обострение хронического тонзиллита.

Учитывая клинико-лабораторные данные, больному был поставлен диагноз: обострение хронического тонзиллита, носительство нетоксигенных *C.diphtheriae*.

Параллельно с традиционными методами лабораторных исследований по способу-прототипу, материал был исследован методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами по заявляемому способу с целью идентификации выделенного возбудителя. Указанным способом, путем сопоставления с картинками амплификации контрольных штаммов, установлено, что возбудитель принадлежит к виду *Corinebacteria diphtheriae*, биохимическому варианту *Gravis* токсигенный.

С учетом результатов исследования по заявляемому способу, результатов ЭКГ-исследований, роста титра противодифтерийных антител в РПГА, можно полагать, что данный больной перенес дифтерию ротоглотки.

Результаты идентификации возбудителей дифтерии методом ПЦР соответствуют клинической картине, данным ЭКГ и иммунологических исследований в 84,3% случаев, что превышает точность исследования бактериологическими методами (43,7%).

По сравнению с прототипом заявляемый способ позволит повысить точность, сократить затраты времени и труда.