

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7

Дата введения 2001-02-04

1. РАЗРАБОТАНЫ Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Л.Г.Подунова, Н.С.Кривопалова, Р.С.Сорокина), Центром госсанэпиднадзора в Тульской области (Л.И.Шишкина, Т.А.Попова, А.Я.Сыпченко, Н.М.Корнеева), Государственным научным центром прикладной микробиологии (М.В.Храмов).

2. УТВЕРЖДЕНЫ Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации - Первым заместителем министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г.Онищенко 4 ноября 2000 г.

3. ВВЕДЕНЫ ВПЕРВЫЕ.

1. Область применения

1. Настоящие методические указания предназначены для бактериологических лабораторий центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора, других учреждений системы здравоохранения Российской Федерации, осуществляющих бактериологическую диагностику острых кишечных инфекций с гемоколитом и развитием гемолитико-уремического синдрома, а также обследование контактных в очагах заболевания и контроль за качеством продовольственного сырья и пищевых продуктов.

2. Методические указания определяют методы обнаружения, выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7 и разработаны в связи с отсутствием в настоящее время нормативных документов по данному разделу бактериологических исследований.

3. Методические указания являются обязательными при контроле продуктов детского питания, молочных и мясных продуктов в ходе проведения противоэпидемических мероприятий при возникновении вспышек, а также осуществления санитарно-эпидемиологического надзора.

4. Настоящие методические указания созданы с целью унификации и дальнейшего совершенствования бактериологических методов выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7 в связи с регистрацией данной патологии на территории Российской Федерации, а также роста заболеваемости вспышечного характера и спорадической за рубежом.

2. Сущность метода

Методические указания содержат описание микробиологического исследования с целью выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7 из биоматериала от больных неосложненными диареями, острыми кишечными инфекциями с гемоколитом и развитием гемолитико-уремического синдрома, от контактных в очаге, а также пищевых продуктов, сырья.

Предлагаемый дифференциально-диагностический метод основан на использовании некоторых

особенностей биохимических свойств данного микроорганизма: отсутствии фермента β -D-глюкуронидазы и способности ферментировать сорбитол, а также на наличии у E. coli O157:H7 такого "маркера", как продукция веротоксинов (VT1, VT2).

Для осуществления возможности практического использования данной методики в течение короткого периода времени разработана отечественная питательная среда "Сорбитол E. coli O157:H7 агар" (ФС 42-0027-00) для выделения E. coli O157:H7 из клинического материала, объектов окружающей среды (разработчик - Государственный научный центр прикладной микробиологии, отделение "Питательные среды", г.Оболensk Серпуховского района Московской области), а также созданы диагностические сыворотки для реакции агглютинации и методика определения веротоксинов в клиническом материале.

Огромный интерес, проявляемый к острым кишечным инфекциям с гемолитико-уремическим синдромом (ГУС) со стороны научных центров и практического здравоохранения за рубежом и в нашей стране, закономерен.

Количество регистрируемых заболеваний острыми кишечными инфекциями с гемолитико-уремическим синдромом, как вспышечного характера, так и спорадических, ежегодно возрастает (США, Канада, Финляндия, Япония, Европа).

Этиологическим фактором этих заболеваний являются энтерогеморрагические кишечные палочки, продуцирующие веротоксины (шигаподобные токсины). Они представлены довольно большим разнообразием серологических вариантов, из которых E. coli O157:H7 имеет наибольшее эпидемиологическое значение в качестве причин неосложненных диарей и кровавого поноса с последующим развитием ГУС.

К настоящему времени биология эшерихии E. coli O157:H7, эпидемиология, патогенез и диагностика связанных с ней заболеваний достаточно изучены.

Первые сведения о выделении E. coli O157:H7 и регистрация данной патологии в нашей стране имели место в Тульской области, где диагностика острых кишечных инфекций с гемолитико-уремическим синдромом начата с конца 1996 года.

Результаты выделения E. coli O157:H7 из клинического материала от детей, больных ОКИ, сырая, пищевых продуктов (сырого мяса, молока) получены в 1997-99 гг.: установление этиологического фактора (E. coli O157:H7) случаев острых кишечных инфекций, осложненных гемолитико-уремическим синдромом, составило в Тульской области 43%, высеваемость E. coli O157:H7 из пищевых продуктов и сырья 1,96%; высеваемость культур от животноводов и доярок ферм - 9%.

Наибольшему риску подвержены дети до 5 лет и пожилые люди.

Естественным резервуаром бактерий E. coli O157:H7, патогенных для человека, служит крупный рогатый скот, овцы. Наиболее частый путь распространения этой инфекции - пищевой. Основным фактором передачи является сырая говядина, особенно мясной фарш, мясные полуфабрикаты, прошедшие недостаточную термическую обработку, сырое молоко. Отмечены случаи передачи возбудителя через воду.

3. Нормативные ссылки

3.1. "Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан" от 22.07.93 г. N 5487-1.

3.2. Федеральный закон "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" от 30 марта

1999 г. N 52-ФЗ.

3.3. СанПиН 2.3.2.560-96 "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов"*.

* Действуют СанПиН 2.3.2.1078-01.

3.4. ГОСТ 26668-85 "Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических исследований".

3.5. ГОСТ 26669-85 "Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов".

3.6. ГОСТ 26670-91 "Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов".

3.7. ГОСТ 10444.1-84 "Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе".

3.8. ГОСТ Р 50474-93 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)".

3.9. ГОСТ Р 50480-93 "Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода Salmonella".

3.10. ГОСТ 9225-84 "Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа".

3.11. ГОСТ 9792-73 "Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб".

3.12. ГОСТ 9958-81 "Изделия колбасные и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа".

3.13. ГОСТ 21237-75 "Мясо. Методы микробиологического анализа".

3.14. ГОСТ 4288-76 "Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса. Правила приемки и методы испытания".

3.15. ГОСТ Р 50396.0-92 "Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям".

3.16. ГОСТ 7702.2.2-93 "Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек".

3.17. ГОСТ 7702.2.3-93 "Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы выявления сальмонелл".

3.18. МУ 04-723/3 от 17.12.84 г. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями.

3.19. Инструкция к применению "Набора реагентов для выявления веротоксина у эшерихий" (фирма "Seiken", Япония).

4. Методы забора, доставки проб клинического материала от больных и контактных

Важным условием выделения эшерихий E. coli O157:H7 из клинического материала является отбор

и доставка его в лабораторию в возможно ранние сроки: оптимальными сроками являются 1-3 день от момента заболевания.

У больных интенсивность выделения возбудителя снижается, достигая 50% и более низкого уровня через 5-8 дней от начала заболевания. Гемолитико-уремический синдром обычно развивается спустя, как минимум, одну неделю после первых признаков диареи, и вероятность обнаружения возбудителя к этому времени существенно уменьшается.

Материалом для бактериологического исследования служат в первую очередь испражнения, моча.

Испражнения собирают в консервант, в качестве которого можно использовать фосфатно-буферную или глицериновую смеси. В случае доставки материала в течение 2 часов с момента забора нативные испражнения отбирают в стерильные флаконы.

При обследовании контактных лиц с целью выявления бактерионосителей возможно взятие материала ректальными тампонами, проволочными петлями.

Мочу после туалета наружных половых органов собирают в стерильную посуду. Перед посевом мочу центрифугируют и засевают осадок. В случае небольшого количества осадка засевают нативную мочу в среду обогащения двойной концентрации в равных объемах (приложение 1).

5. Методы подготовки пищевых продуктов для бактериологического исследования и схемы посева на питательные среды

Методы отбора проб, хранение и подготовка их к анализу регламентированы в действующих нормативных документах на конкретный вид продукта (раздел 3 "Нормативные ссылки").

Проведение испытаний различных пищевых продуктов устанавливает единый метод выявления в определенной навеске пищевого продукта колиформных бактерий в соответствии с ГОСТ Р 50474-93 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)". По классификации кишечных палочек *E. coli* O157:H7 относится к энтерогеморрагическим, энтеропатогенным кишечным палочкам, поэтому выявление ее как патогена необходимо проводить в 25 г продукта. Возможно выявление *E. coli* O157:H7 в других объемах, регламентированных нормативной документацией на конкретный вид продукта, а также СанПиН 2.3.2.560-96 "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов" (приложения 2, 3).

6. Проведение анализа

Принципы бактериологического исследования с целью выделения *E. coli* O157:H7 не отличаются от общепринятых для возбудителей острых кишечных инфекций и включают методы классического бактериологического исследования, основанные на выделении чистой культуры микроорганизма и последующей его идентификации по культурально-морфологическим, биохимическим, антигенным свойствам. Основным критерием отнесения штамма к группе энтерогеморрагических эшерихий являются данные, подтверждающие продукцию веротоксинов. Штаммы, не продуцирующие токсинов, не могут считаться возбудителями эшерихиозов у людей.

6.1. Посев клинического материала с целью выделения *E. coli* O157:H7 проводится на питательную среду Сорбитол *E. coli* O157:H7 агар (прямой посев) и в соотношении 1:5 в среды накопления, которыми могут служить бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью (ГОСТ Р 50474-93), GN Enrichment Broth асс. to HAJNA (Cat. N 10756, фирма "MERCK", Германия). При отсутствии нативного материала испражнения, забранные в консервант, засевают в среду обогащения двойной концентрации (приложение 1).

6.2. Посев пищевых продуктов для выявления БГКП (колиформных бактерий) в определенной навеске продукта проводится в соответствии с ГОСТ Р 50474-93. Дополнительной питательной средой для выявления *E. coli* O157:H7 является Сорбитол *E. coli* O157:H7 агар (приложение 2), потому что плотная питательная среда, используемая для выделения колиформных бактерий (Эндо), не может быть использована для целенаправленного поиска *E. coli* O151:H7, т.к. данный микроорганизм разлагает лактозу подобно другим эшерихиям.

6.3. Подготовку пищевых продуктов для выявления *E. coli* O157:H7 с применением сред обогащения осуществляют в соответствии с ГОСТ Р 50480-93 "Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella*", но в качестве сред обогащения могут быть использованы среда Кесслера, трипказо-соевый бульон, бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью, Грам-негативный бульон (GN-бульон). После термостатирования посевов при 37 °С в течение 18-24 ч проводят высеивание на плотную среду Сорбитол *E. coli* O157:H7 агар, обладающую дифференциальными и селективными свойствами (приложение 3).

Отличительным биохимическим свойством *E. coli* O157:H7 является отсутствие способности ферментировать сорбитол. Для выделения штаммов *E. coli* O157:H7 необходимо использовать Сорбитол *E. coli* O157:H7 агар или среды зарубежного производства: Fluorocult[®] *E. coli* O157:H7 Agar (Cat. N 1.04036); Sorbitol MacConkey Agar (SMAC-agar) Cat. N 1.09207; Fluorocult[®] HC Agar acc. to SZABO Cat. N 1.09206 (фирма "MERCK", Германия).

Характеристика роста *E. coli* O157:H7 на плотных питательных средах представлена в табл.1.

Таблица 1

Характеристика роста *E. coli* O157:H7 на плотных питательных средах

Питательная среда	Характер колоний
Среда ЭНДО	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, темно-красные, Лас ⁺
Сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар	Колония средней величины, выпуклые, круглые, влажные, бесцветные, прозрачные. Могут быть бледно-розовые со светлым ореолом, мутноватые
Fluorocult <i>E. coli</i> O157:H7 Agar	Прозрачные или полупрозрачные колонии, бесцветные, размером 1,5-2 мм
Простой питательный агар	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, блестящие, прозрачные в проходящем свете
Агар Плоскирева, Висмут-сульфит агар, ЖСА, среда Сабуро	Роста нет. Иногда на среде Плоскирева - мелкие выпуклые колонии красноватого цвета, Лас ⁺
Кровяной агар	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, бледноватые, иногда сероватые. Гемолиз отсутствует

Если на чашке с Сорбитол E. coli O157:H7 агаром выросли 1-2 сорбитол-отрицательных колонии, то серологические исследования проводят после посева на одну из сред для первичной дифференциации: агар Клиглера, Олькеницкого, Ресселя. В случае роста на чашке Петри однотипной культуры с 3-5 колониями проводят серологическую идентификацию на стекле с "О"- и "Н"-сыворотками к антигенам E. coli O157:H7, либо с латексным антительным диагностикумом.

Не менее 5 сорбитол-отрицательных колоний пересевают на среду для первичной идентификации. Посевы инкубируют в термостате при 37 °С 18-24 часа. При получении на следующий день результатов, подтверждающих принадлежность культуры к роду эшерихий (ферментация глюкозы и лактозы с образованием кислоты и газа, отсутствие H₂S), проводят дальнейшую биохимическую и серологическую идентификацию (приложения 2, 3).

7. Биохимические свойства и серологическая идентификация E. coli O157:H7

Серологическая идентификация предусматривает выявление "О"- и "Н"-антигенов у эшерихий E. coli O157:H7.

Определение "О"- и "Н"-антигенов проводится в обычной реакции агглютинации на стекле с эшерихиозными сыворотками к E. coli O157:H7, выпускаемыми АООТ "Биомед" имени И.И.Мечникова (Московская область, Красногорский район, с.Петрово-Дальнее) или латексным антительным диагностикумом производства ГНЦ ПМ (Московская область, Серпуховской район, г.Оболенск). Реакция агглютинации осуществляется в соответствии с наставлениями по применению данных сывороток.

Необходимо отметить, что E. coli O157:H7 имеет антигенные связи с другими эшерихиями (табл.2).

Таблица 2

Антигенные связи E. coli O157:H7 и других эшерихий

E. coli	Наименование сывороток	
	O157	H7
O2-O17	-	-
O19-O49		
O51-O54		
O56-O115		
O117-O164		
O50	+	-
O116		
O1; O18; O55	-	+
O157:H7	+	+

Все штаммы, дающие положительную реакцию агглютинации, подлежат обязательной биохимической идентификации для подтверждения видовой принадлежности. Биохимические свойства *E. coli* O157:H7 отражены в табл.3.

Таблица 3

Основные биохимические свойства *E. coli* O157:H7

N	Тест или субстрат	Наименование штаммов	
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i>
1	Сорбитол	-	+
2	β -D-глюкуронидаза	-	+
3	Цитрат Симмонса	-	-
4	Мочевина	-	-
5	Малонат натрия	-	-
6	Сероводород	-	-
7	Фенилаланиндезаминаза	-	-
8	Ацетат натрия	+	+
9	Рамноза	\pm	\pm
10	Глюкоза (газ)	+	+
11	Лактоза	+	\pm
12	Сахароза	\pm	\pm
13	Маннит	+	+
14	Арабиноза	+	+
15	Адонит	-	-
16	Инозит	-	-
17	Салицин	(\pm)	\pm
18	Дульцит	(\pm)	\pm
19	Раффиноза	\pm	\pm
20	Ксилоза	+	\pm

21	Орнитиндекарбоксилаза	+	±
22	Лизиндекарбоксилаза	+	+
23	Аргининдегидролаза	-	±
24	Индол	+	+
25	β -D-галактозидаза	+	+
26	Реакция с метиловым красным	+	+
27	Реакция Фогеса-Проскауэра	-	-

Характерной биохимической особенностью энтерогеморрагических кишечных палочек *E. coli* O157:H7, в отличие от других *E. coli*, является отсутствие способности продуцировать фермент β-D-глюкуронидазу (95% штаммов) и расщеплять сорбитол.

В остальном биохимические свойства штаммов *E. coli* O157:H7 практически не отличаются от таковых у *E. coli*: ферментируют с кислотообразованием углеводы - глюкозу, маннит, лактозу; не ферментируют адонит и инозит; сбраживают вариабельно рамнозу, сахарозу, салицин, дульцит, раффинозу; не образуют сероводород; не утилизируют, цитрат, малонат; не имеют фенилаланиндезаминазы, уреазы; утилизируют ацетат; дают положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную Фогеса-Проскауэра; обладают ферментом β-D-галактозидазой; большинство штаммов (89%) расщепляют аминокислоты лизин и орнитин, не расщепляют аргинин.

Определение фермента β-D-глюкуронидазы возможно при использовании питательных сред фирмы MERCK: Fluorocult[®] *E. coli* O157:H7 Agar или Fluorocult[®] HC Agar acc. to SZABO. Указанные среды в своей рецептуре содержат 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG), который при наличии у исследуемого штамма β-D-глюкуронидазы расщепляется ею до глюкуроновой кислоты и компонента 4-methylumbelliferone, который обнаруживается по флюоресценции колоний при освещении длинноволновой ультрафиолетовой лампой (UV-366 nm). Не продуцируя данного фермента, *E. coli* O157:H7 образуют на вышеуказанных средах флюоресценс-негативные колонии.

Для определения β-D-галактозидазы и сорбитола используются биохимические пластины для дифференциации энтеробактерий (ПБДЭ) производства НПО "Диагностические системы" (г.Нижний Новгород) и планшеты ММТЕ 1, ММТЕ 2 (НПО "Аллерген", г.Ставрополь).

В практике бактериологических лабораторий учреждений системы здравоохранения широко используются для идентификации энтеробактерий: API-тесты и биохимический экспресс-анализатор "ATB identification" фирмы BioMerieux (Франция), тест-система BBL "Crystall" фирмы "Becton Dickinson" (Германия), а также идентификатор микроорганизмов MicroTax фирмы "SY-LAB" (Австрия).

С помощью поименованных тест-систем возможно определение всех биохимических свойств и *E. coli* O157:H7, включая фермент β-D-глюкуронидазу.

8. Определение факторов патогенности *E. coli* O157:H7

При подтверждении принадлежности выделенной культуры к роду *Escherichia*, серогруппе O157 или *E. coli* O157:H7 необходимо определение способности данной культуры продуцировать веротоксины (VT1, VT2).

Настоящие методические указания предлагают апробированную и модифицированную методику выявления веротоксинов выделенных культур микроорганизмов с помощью "Набора реагентов для выявления веротоксина у эшерихий" (фирма "Seiken", Япония) для постановки реакции обращенной пассивной латексной агглютинации (далее РОПЛА), методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора Ridascreen "Веротоксин" (фирма "Biorpharm", Германия) и методом биологических проб.

8.1. Определение веротоксинов методом реакции обращенной пассивной латексной агглютинации

Принцип метода заключается в том, что латексные частицы данного набора, сенсibilизованные специфическими антителами против VT1 и VT2, реагируют с веротоксином образца, что приводит к агглютинации. Комплекс AG+AT диффузно осажается на дно лунки микропланшета, образуя "зонтик". Об отсутствии веротоксина свидетельствует отрицательная реакция агглютинации - образование плотной латексной бляшки - "пуговки". Методика постановки реакции обращенной пассивной латексной агглютинации аналогична РПГА, проста в постановке и учете результатов. Важным моментом является приготовление образцов из культур эшерихий, позволяющее в полной мере разрушать бактериальные клетки и экстрагировать токсин. В наставлении по применению предложены два варианта приготовления образцов, но оба варианта требуют сложных питательных сред, культивирования в течение 18-20 ч. на качалке, разрушения клеток с помощью полимиксина В, что является трудоемким для практических лабораторий. Разрушение бактериальных клеток можно проводить с помощью ультразвука на установке УЗТ-101 Ф, для чего делается посев изучаемого штамма на триптозный ГРМ-агар (аналогичной импортной средой является агаризованная среда Brain-heart infusion broth (ВНН), Cat. N 51009, фирма "BioMerieux", Франция) с добавлением 90 мкг/мл линкомицина.

После 18-20-часового инкубирования при 37 °С выросшую на чашке культуру смывают 3 мл физиологического раствора. Микробную взвесь пипеткой переносят в пробирку диаметром 20-23 мм высотой 95 мм. Полученный таким образом образец подвергают ультразвуковой обработке интенсивностью 1 Вт/см³, при импульсном режиме работы 10 миллисекунд в течение 5 мин, погружая электрод в микробную взвесь (после каждого образца электрод обрабатывают 70° этиловым спиртом).

Обработанную ультразвуком микробную взвесь переносят в центрифужные пробирки, центрифугируют при 3000 об/мин 30 мин. Для обнаружения веротоксина берется супернатант.

Постановка реакции с полученным супернатантом и учет результатов обращенной пассивной латексной агглютинации подробно описаны в наставлении по применению набора реагентов "VEROTOX-F", с помощью которого возможно выявление как VT1, так и VT2.

Данная реакция для выявления веротоксинов у эшерихий разных серологических групп, в т.ч. *E. coli* O157:H7, имеет преимущества перед другими методами: высокая точность, простота постановки, учет результатов реакции через 18-20 часов.

8.2. Определение веротоксинов методом иммуноферментного анализа

Для определения веротоксинов выделенных культур *E. coli* O157:H7 может быть использован метод иммуноферментного анализа с применением для этих целей наборов Ridascreen "Веротоксин" (Cat. N

R-5701 и C-2201, фирма "Biorpharm", Германия). В основе процедуры лежит взаимодействие антигенов с антителами. Поставляемый в комплекте набора планшет сенсibilизирован моноклональными антителами к веротоксинам 1 и 2 (VT1 и VT2). Для достижения достаточной чувствительности при определении веротоксинов в выделенных культурах перед иммуноферментным анализом необходимо провести культивацию патогенов в средах обогащения (см. п.10.3 "Реактивы, питательные среды") в течение 18-24 часов при 37 °С. В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 определений. Постановка иммуноферментного анализа для выявления веротоксинов проводится в соответствии с методикой, прилагаемой в наставлении к набору.

8.3. Определение веротоксинов методом биологических проб

8.3.1. Определение веротоксинов культур *E. coli* O157: H7

При отсутствии набора реагентов для выявления веротоксинов выделенных штаммов *E. coli* O157:H7 (РОПЛА, ИФА) определить веротоксины в супернатанте выделенного штамма можно путем биопробы с использованием белых мышей. Для биопробы следует взять 4 мышей весом 16-18 граммов и двум мышам ввести внутрибрюшинно по 1 мл супернатанта. Две другие мыши остаются контрольными, им вводится по 1 мл прокипяченного в течение 45 минут супернатанта. При положительном результате мыши погибают через 10-12 часов. В этом случае определяется комплекс токсинов (VT1+VT2) или один из них, присущий изучаемому штамму. Вскрытие мышей позволяет наблюдать патологические изменения в толстом кишечнике, характеризующиеся явлениями гемоколита (отек слизистой, эритемы, геморрагии). Мыши контрольной группы остаются живы.

8.3.2. Определение веротоксинов в клиническом материале

В случае получения отрицательного результата при исследовании нативного материала путем посева на Сорбитол *E. coli* O157: H7 агар (прямого и через среду обогащения) или позднего обследования больного ОКИ, когда вероятность выделения культуры резко снижается, возможно определение веротоксинов непосредственно в испражнениях. Испражнения в лабораторию доставляются во флаконе в нативном виде. Не менее 1 г переносят в центрифужную пробирку, заливают 4-5 мл физиологического раствора, размешивают стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре в течение 30 мин, центрифугируют при 3000 об/мин 30 мин, надосадочную жидкость используют для выявления веротоксинов методом биологических проб. Надосадочная жидкость после центрифугирования фекалий делится на 2 пробы: одна проба кипятится в пробирке 40-45 минут с целью разрушения веротоксина и используется как контрольная. На каждую пробу используется по 2 мыши, которым внутрибрюшинно вводится по 1 мл надосадочной жидкости испражнений. В результате мыши, которым был введен нативный экстракт фекалий, гибнут через 10-12 часов при наличии веротоксина, а мыши контрольной группы остаются живы.

8.4. Определение веротоксинов в клиническом материале

При наличии незначительного количества возбудителя в пробах и невозможности его выделения классическим методом (на поздних сроках заболевания), а также для получения быстрого результата возможно определение веротоксинов непосредственно из фекалий.

Обнаружение веротоксинов в испражнениях больных является таким же достоверным методом, как и выделение микроорганизма. Основные преимущества этого метода - быстрота определения веротоксинов (т.к. не требуется выделения чистых культур) и возможность определения их концентрации на разных этапах заболевания.

Подготовку испражнений проводят аналогично определению веротоксинов для метода биопроб (п.8.3.2). Надосадочную жидкость после центрифугирования испражнений в физрастворе используют для определения веротоксинов в реакциях (РОПЛА, ИФА) аналогично обнаружению токсинов

выделенных культур *E. coli* O157:H7. Методика позволяет определить токсин в фекалиях не только качественно, но и показать его концентрацию.

При определении факторов патогенности особый интерес представляют методы, позволяющие обнаруживать токсин бактериального специфического липополисахарида (ЛПС) *E. coli* O157:H7, а также гены вирулентности посредством изучения цитопатогенной активности в отношении культуры клеток HeLa или почечных клеток Vero. Эффективно также использование методов генетических зондов и ПЦР. Эти исследования недоступны для практических лабораторий и проводятся, как правило, в референс-лабораториях.

Исследование крови с целью обнаружения веротоксинов проводить не рекомендуется, поскольку веротоксины, обладая исключительно высоким аффинитетом к рецептору УВ 3, очень быстро связываются с ним и практически никогда не определяются в сыворотке крови.

9. Серологическая диагностика

Выявление в сыворотке крови больных эшерихиозом, обусловленным *E. coli* O157:H7, антител к О-антигену и антитоксических антител является перспективным при диагностике на поздних сроках заболевания, а также для определения причины развития у больных гемолитико-уремического синдрома.

Однако отсутствие отечественных диагностикумов и анатоксинов не позволяет в настоящее время использовать серологические реакции в сети практических лабораторий.

10. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды

10.1. Аппаратура и инструментарий

Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382-72
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 \pm 5) °С	ТУ 64-1-28-70-76
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений рН \pm 0,01	ГОСТ 9245-79
Баня водяная с подогревом	ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104-88 Е*

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ 24104-2001.

Микроскоп биологический МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБР-1, МБР-3	ГОСТ 8284-78
---	--------------

Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569-89 Е*
---	------------------

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51935-2002.

Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной

Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С, ГОСТ 13646-68 с ценой деления шкалы 1 °С

Чашки биологические (Петри) ГОСТ 23932-90

Шпатели стеклянные

10.3. Реактивы, питательные среды

Агар микробиологический ГОСТ 17206-96

Агар сухой питательный ФС 42-188 ВС-90

Бромтимоловый синий ТУ 6-09-20-86-77

Бриллиантовый зеленый ТУ 6-09-4279-76

Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72

Глицерин ГОСТ 6824-96

D-глюкоза, ч. ГОСТ 6038-79

D-лактоза, 1-водная ТУ 6-09-22-98-79

Желчь сухая или желчь нативная сельскохозяйственных животных, стерильная ОСТ 49 278-75

Калий фосфорно-кислый однозамещенный, ч. ГОСТ 4198-75

Калий фосфорно-кислый двузамещенный, ч. ГОСТ 2493-75

Кристаллический фиолетовый ТУ 6-09-4119-75

L-аргинин гидрохлорид ТУ 6-09-124-63

L-лизин гидрохлорид

L-орнитин моногидрохлорид

Малонат натрия

Масло иммерсионное для микроскопии ГОСТ 13739-78

Натрий фосфорно-кислый двузамещенный, безводный ГОСТ 4172-76

Натрий хлористый (ч., х.ч. или ч.д.а.) ГОСТ 4233-77

Набор для окраски по Граму

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей ГОСТ 13805-76

ГРМ-агар

ФС 42-3377-97 (ГНЦ ПМ*)

* Производитель - Государственный научный центр прикладной микробиологии, отделение "Питательные среды" (г.Оболensk, Серпуховского района, Московской области).

Триптозный ГРМ-агар и ГРМ-бульон	по заказу экспериментальными сериями (ГНЦ ПМ)
Сахароза	ГОСТ 5833-75
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962-67*

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652-2000.

Соль Мора	ГОСТ 4208-72
Панкреатический гидролизат казеина	ТУ 9385-002-00479327-94 (ГНЦ ПМ); ФС 42-3440-97
Сорбитол	(АООТ "Биомед*")

* Производитель - АООТ "Биомед" имени И.И.Мечникова (Московская область, Красногорский район, с.Петрово-Дальнее).

Сухой питательный бульон (ГРМ-бульон)	ФС 42-3378-97 (ГНЦ ПМ)
Среда Клиглера	ФС 42-3387-97 (АООТ "Биомед"); ФС 42-0023-00 (ГНЦ ПМ)
Среда Кесслера сухая	ФС 42-0024-00 (ГНЦ ПМ)
Среда Сорбитол E. coli O157:H7 агар	ФС 42-0027-00 (ГНЦ ПМ)
Среда Ресселя	ФС 42-3587-98
Среда Эндо	ФС 42-186 ВС-88
Феноловый красный, индикатор	ГОСТ 4599-73
Фуксин основной	ТУ 6-09-4119-75
Цитратный агар Симмонса	ВФС 42-3344-99 (ГНЦ ПМ)
Среды Гисса	ФС 42-3644-98
Среда Олькеницкого	экспериментально-производственные серии (ГНЦ ПМ)

Возможно использование коммерческих питательных сред, диагностических препаратов и систем идентификации зарубежных фирм, предназначенных для приведенных методов. При использовании их следует руководствоваться рекомендациями фирмы-производителя.

Питательные среды и биологические препараты должны иметь международный сертификат качества ИСО 9.000 или EN 29.000.

Селективные питательные среды для обнаружения и выделения E. coli O157:H7

Fluorocult [®] E. coli O157:H7 Agar	Cat. N 1.04036 (фирма "MERCK", Германия)
Fluorocult [®] HC Agar acc. to SZABO	Cat. N 1.09206 (фирма "MERCK", Германия)
Sorbitol MacConkey Agar (SMAC Agar)	Cat. N 1.09207 (фирма "MERCK", Германия)

Среды обогащения

Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью - лабораторного приготовления по ГОСТ Р 50474-93

Brain-heat infusion broth (BHI) (сердечно-мозговой бульон)	Cat. N 51009 (фирма "BioMerieux", Франция)
GN Enrichment Broth acc. to HAJNA (грам-негативный бульон по Хайну)	Cat. N 1.10756 (фирма "MERCK", Германия); Cat. N M 242 (фирма "Ni Media", Индия)
Среда Кесслера сухая	ФС 42-0024-00
Трипказо-соевый бульон	Cat. N 51019 (фирма "BioMerieux", Франция)

Диагностикумы, сыворотки

Набор Ridascheen "Веротоксин"	Cat. N R-5701 (фирма "Biopharm", Германия)
Набор Ridascheen "Веротоксин"	Cat. N C-2201 (фирма "Biopharm", Германия)
Набор реагентов "Verotox-F" для определения веротоксинов методом обращенной пассивной латексной агглютинации (РОПЛА)	Cat. N 342101 (фирма "Seiken", Япония)
Сыворотки диагностические эшерихиозные O157 групповые адсорбированные, сухие для РА	АООТ "Биомед" имени И.И.Мечникова
Н-сыворотка сухая эшерихиозная для определения Н7-антигена	АООТ "Биомед" имени И.И.Мечникова
Латексный антительный диагностикум	экспериментальные серии (ГНЦ ПМ)

10.4. Приготовление растворов реактивов, консервантов и питательных сред

10.4.1. Приготовление растворов реактивов и консервантов

10.4.1.1. Физиологический раствор

0,85 г хлористого натрия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 30 минут. Хранят при комнатной температуре.

10.4.1.2. Фосфатно-буферная смесь

5,34 г натрия фосфорнокислого двузамещенного безводного (Na₂HPO₄) и 0,45 г калия фосфорнокислого однозамещенного (KH₂PO₄) растворяют в 1 дм³ (1000 см³) дистиллированной воды и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 30 минут.

10.4.1.3. Глицериновая смесь

Натрий хлорид	8,5 г
Глицерин нейтральный	500 см ³
Дистиллированная вода	1000 см ³
Натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный 20%-ный раствор	150 см ³

Натрий хлорид растворяют в дистиллированной воде, смешивают с глицерином и добавляют раствор натрия гидрофосфата в таком количестве, чтобы довести рН до 7,8-8,0. Стерилизуют при (112±1) °С в течение 30 минут. После стерилизации рН=7,6-7,8.

10.4.1.4. Раствор бриллиантового зеленого концентрацией 5 г/дм³ (по ГОСТ Р 50474-93)

0,5 г бриллиантового зеленого переносят в фарфоровую ступку и постепенно растирают с добавлением горячей дистиллированной воды, затем раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки. Колбу плотно закупоривают и помещают на 2-3 дня в термостат при 37 °С. После этого раствор фильтруют через бумажный фильтр и хранят в темном флаконе с притертой пробкой.

10.4.1.5. Растворы и реактивы для окраски по Граму

Готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1-84.

10.4.2. Приготовление питательных сред

10.4.2.1. Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью (по ГОСТ Р 50474-93)

Пептон	10,0 г
Лактоза	5,0 г
Натрий двузамещенный фосфорнокислый безводный	6,45 г
Калий однозамещенный фосфорнокислый безводный	2,0 г

Желчь говяжья сухая	20,0 г (или 200 см ³ натуральной желчи)
Бриллиантовый зеленый 0,5%-ный водный раствор	3,0 см ³
Вода дистиллированная	1000 см ³ (в случае использования натуральной желчи 800 см ³)

Ингредиенты тщательно перемешивают в воде, нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1-2 минуты, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45-55 °С и устанавливают рН=7,2±0,1, после чего среду вновь доводят до кипения. Среда не подлежит стерилизации в автоклаве, ее разливают с соблюдением правил асептики по 10 см³ в стерильные пробирки с поплавками или по 100 см³ в стерильные колбы.

10.4.2.2. Среда Кесслера (по ГОСТ Р 50474-93)

Пептон	10,0 г
Лактоза	2,5 г
Желчь говяжья сухая	5,0 г (или 50 см ³ натуральной желчи)
1%-ный водный раствор генцианвиолета (или кристаллического фиолетового, или метилового фиолетового)	2 см ³
Вода дистиллированная	1000 см ³ (в случае использования натуральной желчи 950 см ³)

Ингредиенты тщательно перемешивают, нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1-2 минуты, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45-55 °С, устанавливают рН=7,3±0,2.

Среду разливают по 10 см³ в пробирки с поплавками или в колбы по 100 см³ и стерилизуют при температуре (115±1) °С в течение 20 минут.

10.4.2.3. Сердечно-мозговой бульон (ВНІ), Cat. N 51009, фирма "BioMerieux", Франция

Готовится по прописи, указанной на этикетке, или по инструкции фирмы по приготовлению.

10.4.2.4. Гром-негативный бульон по Хайну (GN Enrichment Broth ace. to HAJNA), Cat. N 10756, фирма "MERCK", Германия (или Cat. N M 242, фирма "Ni Media", Индия)

Готовится по прописи, указанной на этикетке.

10.4.2.5. Трипказо-соевый бульон (Cat. N 51009, фирма "BioMerieux", Франция)

Готовится по прописи, указанной на этикетке.

Среды, поименованные в п.п.10.4.2.6-10.4.2.15, готовятся по прописи на этикетке:

10.4.2.6. Сорбитол *E. coli* O157:H7 агар

10.4.2.7. Агар Клиглера

10.4.2.8. Среда Кесслера

10.4.2.9. Цитратный агар Симмонса

10.4.2.10. ГРМ-агар

10.4.2.11. Среда Ресселя

10.4.2.12. Среды Гисса

10.4.2.13 Тритпозный ГРМ-агар

10.4.2.14. Тритпозный ГРМ-бульон

10.4.2.15. Среда Олькеницкого

Схема выделения *E. coli* O157:H7 из клинического материала

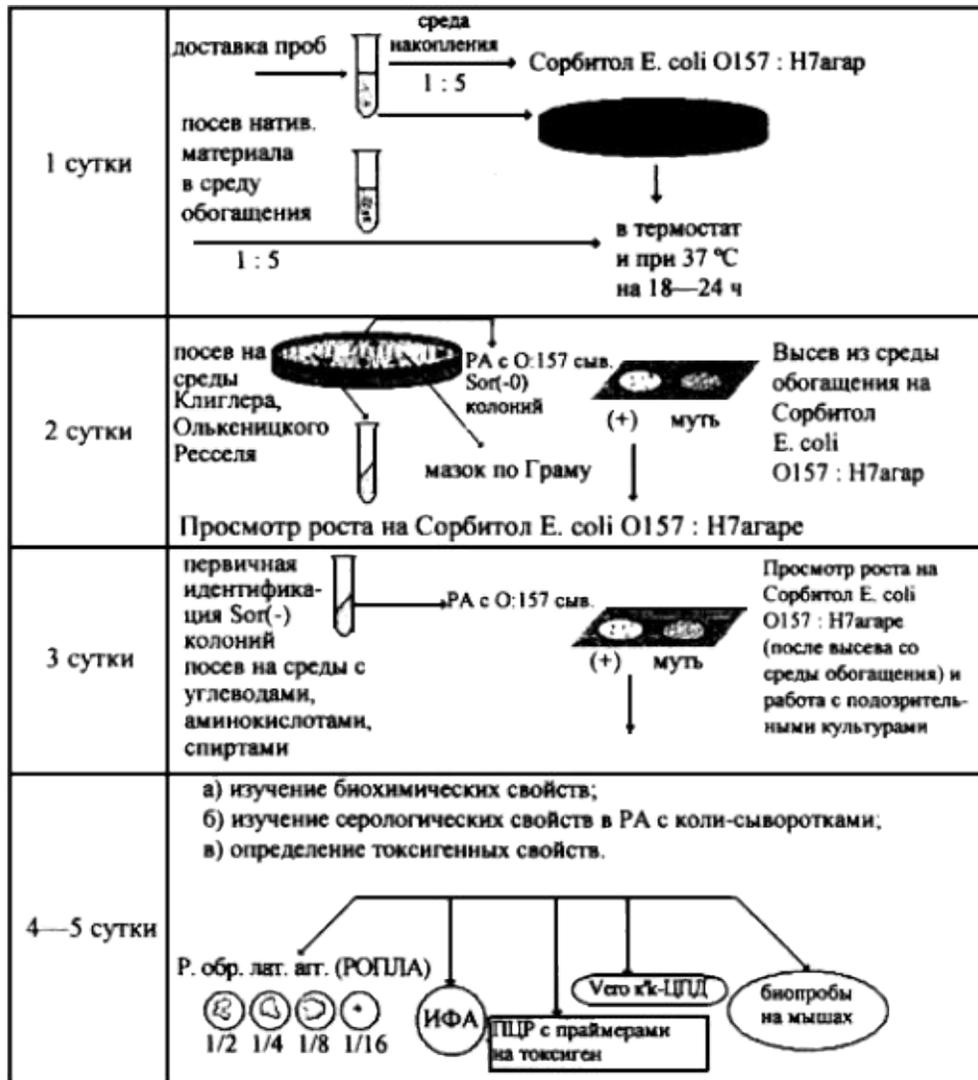


Схема выделения *E. coli* O157:H7 из пищевых продуктов при проведении санитарно-эпидемиологической экспертизы

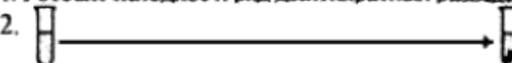
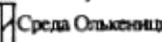
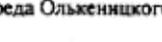
Отбор проб и подготовка пробы	В соответствии с ГОСТами 26668, 26669, 26670 и НД на конкретный вид продукта
Определяемые показатели	БГКП в определенной навеске продукта по ГОСТ Р 50 474
1 сутки	<p>1. Готовят исходное и ряд десятикратных разведений по ГОСТ 26669—85</p> <p>2. </p> <p>инкубация 24—48 ч (36 ± 1 °С)</p>
2 сутки	<p>Предварительный просмотр посевов</p> <p> рост (-), газ (-) → результат отрицательный</p> <p> рост (+), газ (+) →  Сорбитол <i>E. coli</i> O157 : H7агар</p> <p>инкубация 24 ч (37 ± 1 °С)</p>
3 сутки	<p>1. Окончательный учет результатов на среде Кесслера</p> <p> рост (-), газ (-) → результат отрицательный</p> <p> рост (+), газ (+) →  Сорбитол <i>E. coli</i> O157 : H7агар</p> <p>2. Просмотр чашек с высевом на Сорбитол <i>E. coli</i> O157 : H7агаре из среды Кесслера с признаками роста</p> <p> Sor(-) →  Среда Олькеницкого (Клиггера) инкубация 24 ч (37 °С)</p> <p> микроскопия</p> <p> РА с сыв. O157</p>
4 сутки	<p>1.  РА с сыв. O157 →  Среда Олькеницкого (глюкоза+, лактоза+, H₂S-)</p> <p>биохимические св-ва токсигенные св-ва</p> <p>2. Просмотр чашек с высевом на Сорбитол <i>E. coli</i> O157 : H7агар из среды Кесслера с признаками роста через 48 часов</p> <p> Sor(-) →  Среда Олькеницкого</p> <p> микроскопия</p> <p> РА с сыв. O157</p>
5 сутки	<p>Окончательная идентификация:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Культурально-морфологические свойства. 2. Биохимические свойства. 3. Серологические свойства. 4. Токсигенные свойства (биопроба, РОПЛА, ПЦР, ИФА)

Схема выделения *E. coli* O157:H7 из пищевых продуктов

