

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный
санитарный врач

_____ В.И. Качан
19 марта 2010 г.
Регистрационный № 083-0210

**МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
ЭНТЕРОГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ *E.coli* O157:H7**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАНБ Л.П. Титов, канд. биол. наук
Т.С. Ермакова, ст. науч. сотр. Е.Ф. Паньшина

Минск 2010

ГЛАВА 1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая Инструкция по применению (далее — Инструкция) устанавливает методы обнаружения, выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli O157:H7* и разработана в связи с необходимостью совершенствования бактериологической диагностики данного возбудителя.

Предназначена для применения в практике органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, и других организаций здравоохранения, проводящих бактериологическую диагностику острых кишечных инфекций, сопровождающихся гемоколитом и (или) развитием гемолитико-уремического синдрома, а также обследование контактных лиц в очагах заболеваний с контролем качества продовольственного сырья и пищевых продуктов.

ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭНТЕРОГЕМОМОРРАГИЧЕСКОЙ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ *E.coli O157:H7*

1. Ростовые свойства энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli O157:H7* (характеристика роста на плотных питательных средах) представлены в приложении 1 к настоящей Инструкции.

2. Отличительным биохимическим свойством энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli O157:H7* является отсутствие способности ферментировать сорбитол. Для выделения данного возбудителя необходимо использовать специальную питательную среду — сорбитол *E.coli O157:H7* агар или другие аналогичные среды, позволяющие идентифицировать микроорганизмы, не ферментирующие сорбитол.

3. Если на чашке с сорбитол *E.coli O157:H7* агаром (или другой аналогичной питательной средой) выросли 1–2 сорбитолотрицательных колонии, то серологические исследования проводят после посева на одну из сред для первичной дифференциации: агар Клиглера, Олькеницкого, Ресселя. В случае роста 3–5 однотипных колоний проводят серологическую идентификацию с диагностикумом твердофазным на основе коллоидного золота для серотипирования *E.coli O157:H7* или другими методами, позволяющими определить принадлежность выделенной культуры к серогруппе *O157:H7*.

4. Не менее 5 сорбитолотрицательных колоний пересеивают на среду для первичной идентификации. Посевы инкубируют в термостате при 37 °С 18–24 ч. При получении на следующий день культур, подозрительных в отношении принадлежности роду эшерихий (ферментация глюкозы и лактозы с образованием кислоты и газа, отсутствие сероводорода) проводят дальнейшую биохимическую и серологическую идентификацию.

5. Характерной биохимической особенностью энтерогеморрагических кишечных палочек *E.coli O157:H7* является отсутствие фермента β-D-глюкуронидазы (95% штаммов) и способности расщеплять сорбитол. Остальные биохимические свойства штаммов *E.coli O157:H7* не отличаются

от таковых у других *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 метиленовым красным и отрицательную Фогес–Проскауэра; обладают ферментом β -галактозидазой; большинство штаммов (89%) расщепляют аминокислоты лизин и орнитин, но не аргинин.

6. Серологическая идентификация *E.coli O157:H7* предусматривает выявление в реакции агглютинации на стекле с эшерихиозными сыворотками «О» и «Н» антигенов у *E.coli O157:H7*. Необходимо отметить, что *E.coli O157:H7* имеет антигенные связи с другими *Escherichia*, указанные в приложении 2 к настоящей Инструкции. Все штаммы, дающие положительную реакцию агглютинации, подлежат обязательной биохимической идентификации для подтверждения видовой принадлежности.

7. Определение факторов патогенности *E.coli O157:H7* — способности данной культуры продуцировать веротоксины (VT1, VT2) — желательно при подтверждении принадлежности выделенной культуры к роду *Escherichia*, серогруппе *O157* или *E.coli O157:H7*. Для этого можно использовать метод реакции обращенной пассивной латексной агглютинации, метод иммуноферментного анализа или метод биологических проб. Особый интерес представляют методы, позволяющие обнаруживать токсин бактериального специфического липополисахарида (далее — ЛПС) *E.coli O157:H7*, а также гены вирулентности по результатам изучения цитопатогенной активности в отношении культуры клеток *HeLa* или почечных клеток *Vero*. Эффективно также использование методов генетических зондов и ПЦР. Эти исследования выполняются, как правило, в референс-лабораториях. Анализ 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.

ГЛАВА 3. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА ПРОБ

1. Важным условием выделения *E.coli O157:H7* из клинического материала является отбор и доставка его в лабораторию в возможно ранние сроки: оптимально на 1–3-й день от момента заболевания.

2. 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 и моча.

3. Испражнения собирают в консервант, в качестве которого используют фосфатно-буферную, глицериновую смеси или готовые транспортные среды. В случае доставки материала в течение 2 ч с момента забора нативные испражнения отбирают в стерильные флаконы. При обследовании контактных лиц с целью выявления бактерионосителей возможно взятие материала ректальными тампонами, проволочными петлями.

4. 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.

5. Для пищевых продуктов методы отбора проб, хранение и подготовка их к анализу регламентированы в действующих нормативных документах на конкретный вид продукта. *E.coli O157:H7* относится к энтерогеморрагическим, энтеропатогенным кишечным палочкам, поэтому выявление ее как патогена необходимо проводить в 25 г (мл) продукта.

ГЛАВА 4. АППАРАТУРА, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Аппаратура	ТНПА
Термостат для температурного режима 37±1 °С	ТУ 64-1-1382-72
Стерилизатор воздушный медицинский для температурного режима 160±5–180±5 °С	ГОСТ 22649-83
Водяная баня или термостат для температурного режима 45–49 °С (для питательных сред)	ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные общего назначения 2 и 4-го класса точности, с пределом взвешивания до 200 г, допустимая погрешность не более 0,02 г	ГОСТ 24104-88
Анализатор потенциометрический, обеспечивающий измерение рН с погрешностью до 0,01	ГОСТ 9245-79
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды не ниже	ГОСТ 6709-72
Микроскоп биологический, обеспечивающий увеличение от 84х до 1350х	ГОСТ 8284-78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569-89
Центрифуга медицинская с числом оборотов не менее 3000 об/мин	
Аппарат для ультразвуковой дезинтеграции (мощностью 1 Вт/см ³)	
Анализатор иммуноферментный	
Лампа ультрафиолетовая UV 366 nm	
Дозаторы пипеточные одноканальные ДП-1-1000	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241-89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240-89

Электроплитка	ГОСТ 14919-83
Посуда лабораторная стеклянная	
Пробирки (много- или одноразового использования)	ГОСТ 25336-82
Чашки бактериологические (Петри)	ГОСТ 23932-90
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336-82
Пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 мл с ценой деления 0,1 мл	ГОСТ 29227-91
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672-75
Бутылки стеклянные для химических реактивов	
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки Уленгута (поплавки)	
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С, с ценой деления шкалы 1 °С	ГОСТ 13646-68
Расходные материалы	
Вата хлопковая медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556-81
Марля медицинская	
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Химические реактивы, питательные среды	
Бриллиантовый зеленый	ТУ 6-09-4278-76
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Глицерин	ГОСТ 6824-96
Генцианвиолет	
Желчь сухая или желчь нативная сельскохозяйственных животных, стерильная	
Калий фосфорно-кислый однозамещенный	ГОСТ 4198-75
Калий фосфорно-кислый двузамещенный	ГОСТ 2493-75
Кристаллический фиолетовый	ТУ 6-09-4119-75
Линкомицин	
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 13739-78
Метилловый фиолетовый	
Натрий фосфорно-кислый двузамещенный безводный	ГОСТ 4172-76
Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77
Набор для окраски по Граму	
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805-76
ГРМ-агар	ФС 42-3377-97
Триптозный ГРМ-агар и ГРМ-бульон	по заказу
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962
Сухой питательный бульон (ГРМ-бульон)	ФС 42-3378-97
Среда Клиглера	ФС 42-3387-97
Среда Кесслера сухая	ФС 42-0024-00
Среда питательная сухая для выделения и дифференциации <i>E. coli O157:H7</i> «Сорбитол агар»	ТУ 100558032.151-2007

Среда Сорбитол агар	ФС 42-0027-00
Среда Ресселя	ФС 42-3587-98
Среда Эндо	ФС 42-186BC-88
Среда Гисса	ФС 42-3644-98
Среда Олькеницкого	
Цитратный агар Симмонса	ВФС 42-3344-99

1. Все химические реактивы должны соответствовать квалификации не ниже «чистый для анализа» (ЧДА).

2. Допускаются к использованию оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации с аналогичными характеристиками, разрешенные к применению для данных целей в установленном порядке. При их использовании следует руководствоваться рекомендациями производителя.

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

4. Селективные питательные среды, предназначенные для обнаружения и выделения *E.coli O157:H7*, позволяющие их идентифицировать по отсутствию способности ферментировать сорбитол.

5. Среда обогащения: бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью, сердечно-мозговой бульон, грамнегативный бульон по Хайну, среда Кесслера сухая, трипказо-соевый бульон.

6. Диагностикумы, сыворотки: набор Ridascreen «Веротоксин», набор реагентов «Verotox-F» для определения веротоксинов методом реакции обращенной пассивной латексной агглютинации (далее — РОПЛА), сыворотки диагностические эшерихиозные *O157* групповые адсорбированные, сухие для реакции агглютинации (далее — РА), Н-сыворотка сухая эшерихиозная для определения Н7-антигена, латексный антительный диагностикум, диагностикум твердофазный на основе коллоидного золота для серотипирования *E.coli O157:H7*, тест-система диагностическая для дифференциации энтеробактерий «ЭНТЕРО-стрип М», пластины биохимические для дифференциации энтеробактерий, планшеты ММТЕ1, ММТЕ2.

ГЛАВА 5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕАКТИВОВ, КОНСЕРВАНТОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

1. Приготовление физиологического раствора:

0,85 г натрия хлорида растворяют в 100 см³ дистиллированной воды и автоклавируют при давлении 1 атм и температуре 120±2 °С в течение 30 мин. Хранят при комнатной температуре.

2. Приготовление фосфатно-буферной смеси:

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 автоклавируют при давлении 1 атм и температуре 120±2 °С в течение 30 мин.

3. Приготовление глицериновой смеси:

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

Натрий хлорид растворяют в дистиллированной воде, смешивают с глицерином и добавляют 20%-й раствор натрия фосфорнокислого двузамещенного в таком количестве, чтобы довести рН до 7,8-8,0. Автоклавируют при давлении 0,5 атм и температуре 112 ± 1 °С в течение 30 мин. После автоклавирования рН должна быть 7,6–7,8.

4. Приготовление раствора бриллиантового зеленого концентрацией 5 г/дм³ по ГОСТ 30518-97 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)»; далее — ГОСТ 30518-97:

0,5 г бриллиантового зеленого переносят в фарфоровую ступку и постепенно растирают с добавлением горячей дистиллированной воды, 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. Затем раствор фильтруют через бумажный фильтр и хранят в темном флаконе с притертой пробкой.

5. Приготовление растворов и реактивов для окраски по Грамму:

Готовят в соответствии с ГОСТ 10400.1-84 «Консервы. Приготовление растворов красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

6. Приготовление питательных сред:

Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью (по ГОСТ 30518-97)

Пептон сухой ферментативный	10,0 г
Лактоза	5,0 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный	6,45 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный безводный	2,0 г
Желчь сухая	20,0 г
Бриллиантовый зеленый 0,5%-й водный раствор	3,0 см ³
Вода дистиллированная	1000 см ³

Ингредиенты тщательно перемешивают в воде, нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1–2 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45–55 °С и устанавливают рН $7,2 \pm 0,1$, 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. Вместо желчи сухой (20,0 г) можно использовать натуральную желчь (200 см³); в таком случае количество воды дистиллированной уменьшается до 800 см³.

Среда Кесслера (по ГОСТ 30518-97)

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	10,0 г
Лактоза	2,5 г
Желчь сухая	5,0 г
1%-й водный раствор генцианвиолета (или кристаллического фиолетового, или метилового фиолетового)	2,0 см ³
Вода дистиллированная	1000 см ³

7. Ингредиенты тщательно перемешивают, нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1–2 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45–55 °С, устанавливают рН $7,3 \pm 0,2$. Готовую среду разливают в пробирки с поплавками по 10 см³ или в колбы по 100 см³ и автоклавируют при давлении 0,5 атм и температуре 115 ± 1 °С в течение 20 мин. Вместо желчи сухой (5,0 г) можно использовать натуральную желчь (50 см³); в таком случае количество воды дистиллированной уменьшается до 950 см³.

8. Коммерческие питательные среды (сердечно-мозговой бульон, грамнегативный бульон по Хайну, сухой питательный бульон (ГРМ-бульон), трипказо-соевый бульон, среда питательная сухая для выделения и дифференциации *E. coli* O157:H7 «Сорбитол агар», сорбитол *E. coli* O157:H7 агар, среда Клиглера, среда Кесслера сухая, ГРМ-агар, среда Ресселя, среды Гисса, триптозный ГРМ-агар, триптозный ГРМ-бульон, среда Эндо, среда Олькеницкого, цитратный агар Симмонса и др.): готовят по прописи, указанной на этикетке, или по инструкции производителя.

ГЛАВА 6. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОГЕМОРАГИЧЕСКОЙ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ *E. coli* O157:H7

1. Посев нативного клинического материала для выделения *E. coli* O157:H7 проводится на среду питательную для выделения и дифференциации *E. coli* O157:H7 (прямой посев) и в соотношении 1:5 в среды накопления, которыми могут служить бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью (по ГОСТ 30518-97), грамнегативный бульон (GN-бульон). Испражнения, забранные в консервант, засевают в среду обогащения двойной концентрации.

2. Посев пищевых продуктов для выявления *E. coli* O157:H7 в 25 г продукта проводится в соответствии с ГОСТ 30518-97. Дополнительной питательной средой для выявления *E. coli* O157:H7 является сорбитол агар, потому что плотная питательная среда, используемая для выделения колиформных бактерий (Эндо) не может быть использована для целенаправленного поиска *E. coli* O157:H7, так как данный микроорганизм разлагает лактозу подобно другим эшерихиям.

3. Подготовка пищевых продуктов для выявления *E. coli* O157:H7 проводится с применением сред обогащения: среда Кесслера, трипказо-соевый бульон, бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью, грамнегативный бульон (GN-бульон). После термостатирования посевов при 37 °С в течение 18–24 ч проводят высеивание на плотную питательную среду

сорбитол агар, обладающую дифференциальными и селективными свойствами, или другие селективные среды, позволяющие идентифицировать отсутствие ферментации сорбитола.

4. Биохимическая идентификация *E.coli* O157:H7:

для определения биохимических свойств выделенных микроорганизмов могут быть использованы тест-системы: диагностическая для дифференциации энтеробактерий «ЭНТЕРО-стрип М», API, «Crystall», биохимические пластины для дифференциации энтеробактерий (ПБДЭ), планшеты ММТЕ 1, ММТЕ 2 и др., позволяющие идентифицировать *E.coli* O157:H7 как кишечную палочку с отсутствием способности ферментировать сорбитол. В практике бактериологических лабораторий широко используются для идентификации энтеробактерий биохимические анализаторы и другие идентификаторы микроорганизмов. Для определения биохимических свойств выделенных микроорганизмов могут быть также использованы среды Гисса, агар Клиглера, среда Ресселя, среда Олькеницкого, цитратный агар Симмонса. Отношение к окраске по Граму определяют стандартными методами или с помощью набора реактивов по инструкции производителя. Определение фермента β -D-глюкуронидазы возможно при использовании питательных сред Fluorocult* *E.coli* O157:H7 Agar и Fluorocult* HC Agar. Не продуцируя данного фермента, *E.coli* O157:H7 образуют на вышеуказанных средах флюоресценс-негативные колонии (не флюоресцирующие при освещении длинноволновой ультрафиолетовой лампой UV-366 нм).

5. Серологическая идентификация *E.coli* O157:H7:

серотипирование *E.coli* O157:H7 осуществляется с помощью диагностикума твердофазного на основе коллоидного золота для серотипирования *E.coli* O157:H7 согласно инструкции производителя. Используется 18–20-часовая агаровая культура микроорганизмов на мясопептонном агаре. Определение «О» и «Н»-антигенов проводится в обычной реакции агглютинации на стекле с эшерихиозными сыворотками или латексным антительным диагностикумом. Реакция агглютинации осуществляется в соответствии с наставлениями по применению данных сывороток. Выявление в 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.

6. Определение веротоксинов возможно методом реакции обращенной пассивной латексной агглютинации (РОПЛА). Латексные частицы, sensibilizированные специфическими антителами против веротоксинов, реагируют с веротоксином образца, что приводит к агглютинации и диффузному осаждению комплекса «антиген-антитело» на дно лунки микропланшета с образованием «зонтика». Важным моментом является приготовление образцов из культур эшерихий, позволяющее в полной мере разрушать бактериальные клетки и экстрагировать токсин. Разрушение

бактериальных клеток можно проводить с помощью аппарата для ультразвуковой дезинтеграции и затем экстрагировать токсин путем центрифугирования. Для этого делается посев изучаемого штамма на триптозный ГРМ-агар (аналог — сердечно-мозговой бульон) с добавлением 90 мкг/мл линкомицина. После 18–20-часового инкубирования при 37 °С выросшую на чашке культуру смывают 3 мл физиологического раствора. Полученную микробную взвесь пипеткой переносят в пробирку диаметром 20–23 мм высотой 95 мм. Подготовленный таким образом образец подвергают ультразвуковой обработке интенсивностью 1 Вт/см³, при импульсном режиме работы 10 мс в течение 5 мин, погружая электрод в микробную взвесь (после каждого образца электрод обрабатывают 70-градусным этиловым спиртом). Обработанную ультразвуком микробную взвесь переносят в центрифужные пробирки, центрифугируют при 3000 об/мин 30 мин. Для обнаружения веротоксина берется супернатант. Постановку реакции с полученным супернатантом и учет результатов проводят в соответствии с наставлением по применению набора реагентов «Verotox-F».

7. Для определения веротоксинов методом иммуноферментного анализа (далее — ИФА) применяют наборы Ridascreen «Веротоксин», позволяющие провести 96 определений. Поставляемый в комплекте набора планшет сенсibilизирован моноклональными антителами к веротоксинам 1 и 2. Для достижения достаточной чувствительности необходимо провести культивацию патогенов в средах обогащения в течение 18–24 ч. Иммуноферментный анализ для выявления веротоксинов проводится в соответствии с методикой, прилагаемой в наставлении к набору.

8. Для определения веротоксинов культур *E.coli* O157:H7 методом биологических проб следует взять 4 белых мышей весом 16–18 г и двум мышам ввести внутривенно по 1 мл супернатанта, полученного согласно п. 6 гл. 6 настоящей Инструкции. Двум другим мышам (контрольным) вводится по 1 мл прокипяченного в течение 45 мин супернатанта. При положительном результате мыши, которым введен полученный не прокипяченный супернатант, погибают через 10–12 ч, на вскрытии наблюдаются патологические изменения в толстом кишечнике, характеризующиеся явлениями гемоколита (отек слизистой оболочки, эритемы, геморрагии). Мыши контрольной группы остаются живы.

9. При отрицательном результате исследования нативного материала путем посева на Сорбитол *E.coli* O157:H7 агар (прямой и через среду обогащения) или при позднем обследовании больного, когда вероятность выделения культуры резко снижается, возможно определение веротоксинов непосредственно в фекалиях. 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 веротоксина методом биологических проб на

белых мышах, как описано в п. 8 гл. 6 настоящей Инструкции.

10. Надосадочную жидкость после центрифугирования испражнений в физрастворе можно использовать для определения веротоксинов в реакциях (РОПЛА, ИФА) аналогично обнаружению токсинов выделенных культур *E.coli O157:H7* согласно пп. 6 и 7 гл. 6 настоящей Инструкции. Методика позволяет определить токсин в фекалиях не только качественно, но и рассчитать его концентрацию.

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

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

Питательная среда	Характер колоний <i>E.coli O157:H7</i>
Среда Эндо	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, темно-красные, лактозоположительные
Среда питательная сухая для выделения и дифференциации <i>E. coli O157:H7</i> «Сорбитол агар»	Колонии фиолетового цвета со светлым ореолом, ровными краями, диаметром 1,5–2,0 мм
Сорбитол <i>E.coli O157:H7</i> агар	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, бесцветные, прозрачные. Могут быть бледно-розовые со светлым ореолом, мутноватые
Fluorocult <i>E.coli O157:H7</i> Agar	Прозрачные или полупрозрачные колонии, бесцветные, размером 1,5–2,0 мм
Сухой питательный агар (СПА)	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, блестящие, прозрачные в проходящем свете
Агар Плоскирева, Висмут-сульфит агар, желточно-солевой агар (ЖСА), среда Сабуро	Роста нет. Иногда на среде Плоскирева — мелкие выпуклые колонии красноватого цвета, лактозоположительные
Кровяной агар	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, бледноватые, иногда сероватые. Гемолиз отсутствует

Приложение 2

Антигенные связи *E.coli* O157:H7 и других эшерихий

<i>E. coli</i>	Наименование сывороток	
	O157	H7
O2-O17, O19-O49, O51-O54, O56-O115, O117-O164	–	–
O50, O116	+	–
O1, O18, O55	–	+
O157:H7	+	+