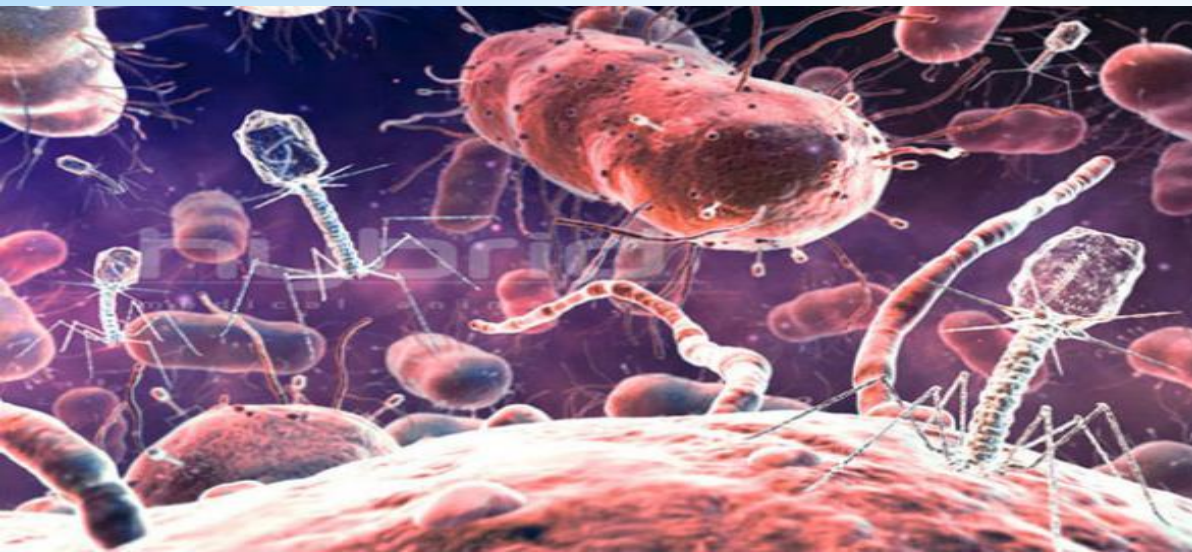




Лабораторной диагностике заболеваний,  
вызываемых *Escherichia coli*, продуцирующих  
шига-токсины (STEC-культуры)



**Escherichia coli**  
**O157:H7, O104:H4**

# Нормативно-методические документы

Федеральный закон от 30 марта 1999 г. N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".

Закон Российской Федерации от 07.02.1992 N 2300-1 "О защите прав потребителей".

Федеральный закон от 02.01.2000 N 29-ФЗ "О качестве и безопасности пищевых продуктов".

"Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании", утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. N 554.

Приказ Минздрава СССР от 24.04.1985 N 535 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений".

"Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)", утвержденные Решением Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 N 299.

СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов".

# Нормативно-методические документы

СП 1.2.036-95 "Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности".

СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)".

СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней и СП 1.3.2885-11 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Дополнения и изменения 2 к СП 1.3.2322-08".

СанПиН 2.1.3.2630-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность".

МУК 4.2.992-00 "Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки E. coli O157:H7".

МУК 4.2.2872-11 "Методы выявления и идентификации патогенных бактерий - возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией".

МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лаборатории, использующих методы амплификации НК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности".

Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Merck (Германия): Методические рекомендации. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 23 с.

# Нормативно-методические документы

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

ГОСТ Р 52816-2007 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)".

ГОСТ Р 53430-2009 "Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа".

ГОСТ 9792-73 "Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц".

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

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

ГОСТ 7702.2.0-95/ГОСТ Р 50396.0-92 "Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям".

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

---

\* На территории Российской Федерации документ не действует. Действует ГОСТ Р 54374-2011, здесь и далее по тексту. -  
Примечание изготовителя базы данных.

ГОСТ Р ИСО 7218-2008 "Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям".

# Эпидемия кишечной палочки в Европе (2011)



Карта заболеваний, вызванных штаммом *Escherichia coli* O104:H4 (на 3 июня 2011)

Серый цвет: не обнаружено

Зелёный: подозрительные случаи

Жёлтый: ?

Оранжевый: есть заболевшие

Красные тона: есть смертельные случаи

# Общие положения

- \* Острые кишечные инфекции с проявлениями геморрагического колита (ГК) и гемолитико-уремического синдрома (HUS), вызываемые эшерихиями, продуцирующими шига-токсины (STEC), распространены во многих странах мира и регистрируются в виде спорадических случаев или вспышек с охватом больших количеств людей: от десятков до нескольких тысяч.
- \* Среди штаммов E.coli особое значение имеют патогенные штаммы, синтезирующие веротоксины (шигаподобные токсины). Выделяется группа энтерогеморрагических штаммов E. coli (EHEC) с высокопатогенными сероварами O157:H7, O26, O103, O111, O145 и др. Продукция веротоксинов является наиболее общим критерием для определения данной группы бактерий. Веротоксины можно классифицировать по основным группам: веротоксины 1 (VT1, SLT1, Stx1) и веротоксины 2 (VT2, SLT2, Stx2). Штаммы EHEC способны продуцировать либо только токсины первой (VT1) или второй группы (VT2), либо обе группы токсинов (VT1) и (VT2) одновременно.
- \* Резервуаром данной инфекции являются крупный рогатый скот, козы и овцы. Загрязнение пищевых продуктов происходит в процессе их приготовления при неудовлетворительном состоянии гигиены на производстве, а также при недостаточной термической обработке продуктов.
- \* Люди заболевают STEC-инфекциями после употребления недоброкачественных мясных продуктов, непастеризованного молока, йогуртов, сыра, овощей, шпината, разных салатов, пророщенных зерен бобовых, соков, других пищевых продуктов и воды, обсемененных STEC-бактериями. Возможно заражение людей при контакте с сельскохозяйственными и домашними животными, а также при непосредственном контакте с больными STEC-инфекцией. Штаммы EHEC представляют серьезную угрозу жизни особенно для пожилых людей и детей до 5 лет.
- \* Наиболее частый путь распространения инфекции - фекально-оральный.
- \* Инкубационный период при STEC-инфекции - в среднем от трех до восьми дней.

**Основными клиническими симптомами при STEC-инфекциях являются** острые абдоминальные боли, диареи, часто с кровью (геморрагический колит), рвота, тошнота, температура может быть незначительно повышена. Большинство заболевших выздоравливает в течение 5-10 дней без каких-либо осложнений. У части больных (до 30%) спустя неделю после начала диареи может развиваться гемолитико-уремический синдром (HUS). Основные симптомы HUS - снижение частоты мочеиспускания, чувство сильной усталости, анемия кожи и слизистых. У больных с HUS развивается острая почечная недостаточность, гемолитическая анемия и тромбоцитопения. Лечение больных с HUS для клиницистов является непростой задачей, поскольку антимикробная терапия STEC-инфекций пока не разработана. **Смертность среди больных HUS высокая и колеблется от 3 до 30%. У переболевших людей может отмечаться непродолжительный период бактерионосительства.**

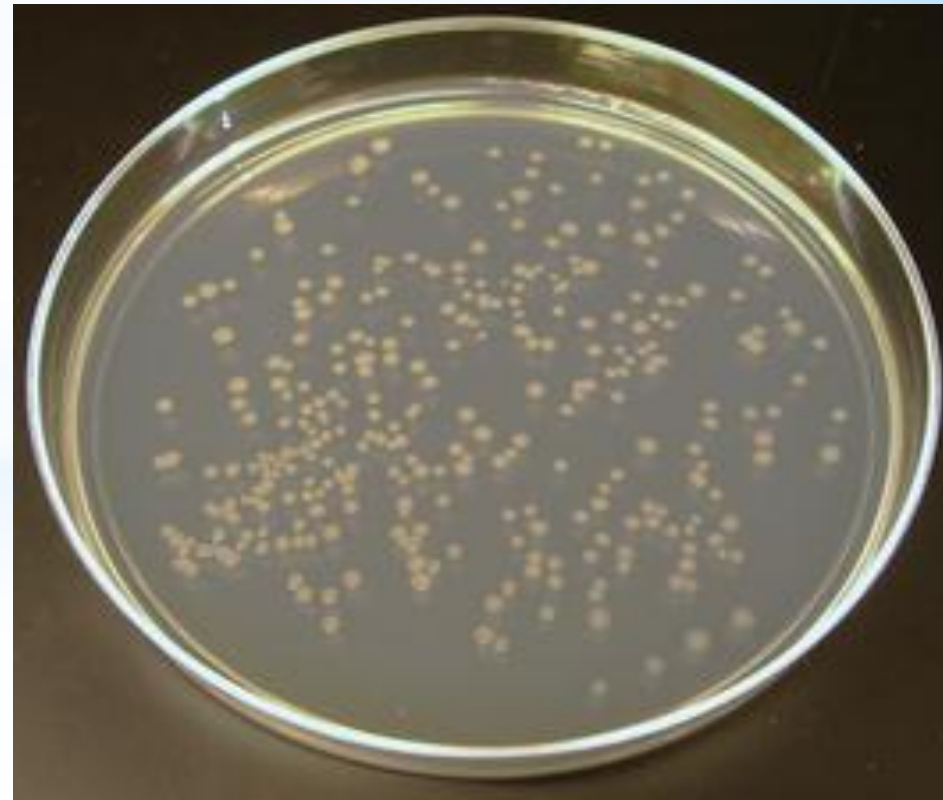
Настоящие методические указания определяют алгоритм выделения из клинического материала и пищевых продуктов и идентификации эшерихий, продуцирующих веротоксины (шигаподобные токсины): а) серовара O104:H4, возбудителя эпидемической вспышки геморрагического колита и HUS в Германии и других странах весной 2011 года; б) энтерогеморрагического серовара O157:H7/O157:H-; в) сероваров, "не относящихся к O157:H7".



**Выделение указанных патогенов проводят на дифференциально-диагностических питательных средах с последующим исследованием чистых культур в реакции латексной агглютинации (РЛА), или методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле, или их дальнейшей идентификацией на иммунохроматографическом тесте с применением питательного бульона для индукции синтеза веротоксинов (содержащий индуктор синтеза веротоксинов - карбадокс).**

**Источником и основным резервуаром этого патогена являются сельскохозяйственные животные: крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи и птица, а также дикие животные. Носительство этого серовара среди сельскохозяйственных животных в России составляет от 2 до 3%.**

По культурально-морфологическим свойствам штаммы серовара O157:H7/O157:H- - типичные представители вида *E. coli*, но имеют некоторые биохимические особенности: не образуют -Д-глюкоронидазу и не ферментируют многоатомный спирт сорбитол. Эти свойства патогена используют при его выделении из клинического материала и пищевых продуктов.



Основными факторами патогенности серовара O157:H7/O157:H- являются веротоксины (шигаподобные токсины) Stx1 и Stx2 (или только Stx2), белок интимин, ответственный за адгезию возбудителя к эпителиальным клеткам кишечника, энтерогемолизин и жгутиковый антиген H7. Перечисленные факторы патогенности детерминируются соответственно генами *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* и *flic*. Указанные гены, а также *rfb* гены, ответственные за синтез соматического O-антигена, являются основными генами-мишенями для диагностических ПЦР-тест-систем, используемых при идентификации серовара *E. coli* O157:H7/O157:H-.

**В геноме этой группы патогенов**, как правило, обнаруживают гены синтеза интимина - *eae* и гены веротоксинов (шигаподобных токсинов) - *stx1* и *stx2* (либо только *stx1* или *stx2*). Поэтому реально диагностировать группу STEC-штаммов, "не относящихся к O157:H7", возможно либо только по обнаружению у них способности продуцировать шига-токсины, либо по индикации у них генов *stx1* и *stx2*.

Серовар *E. coli* O104:H4, явившийся причиной крупной эпидемической вспышки геморрагического колита и тяжелых случаев HUS в Германии и других странах Европы весной-летом 2011 года, охватившей более 4000 человек, по своим культуральным, биохимическим и другим фенотипическим свойствам является типичным представителем вида *E. coli*. Однако его генотип существенно отличается от генотипа "классического" представителя группы энтерогеморрагических эшерихий - *E. coli* O157:H7/O157:H-: он не содержит генов интимина (*eae*), вероцитотоксинов (шигаподобных токсинов) 1-го типа (*Stx1*) и энтерогемолизина. Его геном на 93% идентичен геному штамма *E. coli* 55989, относящемуся к группе энтероаггегативных эшерихий (EAEC), возбудителей диареи у человека, выделенному в Центрально-Африканской Республике. Однако в отличие от энтероаггегативных штаммов в геноме штамма *E. coli* O104:H4 присутствует ген синтеза веротоксина (шигаподобного токсина) 2-го типа (*Stx2*), то есть генотип этого высоковирулентного для человека штамма вобрал в себя факторы патогенности энтероаггегативных эшерихий (способность к агрегации и образованию биопленки на слизистой кишечника) и энтерогеморрагических (способность к синтезу веротоксина (шигаподобного токсина) *Stx2* - основного фактора, обуславливающего HUS у человека). Кроме того, эпидемический штамм

**E. coli O104:H4** характеризуется широким спектром устойчивости к антибактериальным препаратам: к бета-лактамам - ампициллину, амоксициллину/клавулонату, пиперациллину/сульбактаму, цефуроксину, цефуроксиму, цефокситину, цефотаксиму, цефтазидиму, цефподоксиму, а также к стрептомицину, налидиксовой кислоте, тетрациклину и триметоприму/сульфаметоксазолу. Устойчивость к бета-лактамам обусловлена присутствием в геноме штамма бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) - СТХ-М-15 и ТЕМ-1. Наличие у штамма E. coli O104:H4 маркеров резистентности к антибиотикам может быть использовано при его выделении из клинического материала и пищевых продуктов.

# Правила сбора клинического (секционного) материала

Взятие материала от клинически больных и контактных и его доставка в лабораторию для исследования осуществляется в соответствии с МУК 4.2.992-00 "Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки E. coli O157:H7" и МУ N 04-723/3 от 17.12.84 "Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями".

Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет медицинский работник лечебно-профилактического учреждения, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность энтерогеморрагическими эшерихиями (STEC-культуры) E. coli O104:H4. Забор производят в стерильные одноразовые флаконы, пробирки, контейнеры стерильными инструментами. Все виды работ проводят с соблюдением противоэпидемического режима согласно СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней".

Процедуры по забору клинического материала обученный медицинский персонал осуществляет в резиновых перчатках. После процедуры отбора материала перчатки обрабатываются растворами дезинфицирующих средств, руки после снятия перчаток обрабатываются антисептиками в соответствии с СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней".

От одного больного должно забираться не менее трех видов клинического материала. Обязательно следует забирать пробы фекалий, промывные воды из желудка. Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость.

Для постмортальной диагностики используют аутопаты желудка, тонкого и толстого кишечника, печени, селезенки, красного костного мозга.

Сбор материала производят в пробирки с транспортной средой, предоставляемой (или рекомендуемой) фирмой-производителем тест-систем.



# Упаковка и транспортирование образцов

Все материалы, доставляемые в лабораторию, должны быть герметично упакованы в соответствии с СП 1.2.036-95 "Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности" и настоящими методическими указаниями:

- 1) в транспортную емкость (плотно закрывающиеся пластмассовые пробирки или флаконы с завинчивающимися крышками); плотно закрытый верхний конец транспортной емкости вместе с крышкой герметизируют различными пластификаторами (парафин, парафильм и др.); емкость маркируют;
- 2) в полиэтиленовый пакет подходящего размера с ватой (или другим гигроскопичным материалом) в количестве, достаточном для адсорбции всего образца в случае его утечки; полиэтиленовый пакет следует герметично заклеить или запаять.

Образцы от одного пациента могут быть упакованы в один полиэтиленовый пакет. Не допускается упаковывание образцов материалов от разных людей в один и тот же пакет.

В полиэтиленовый пакет вкладывают бланк направления с указанием наименования направляющего учреждения, ФИО больного, возраста, места жительства, предварительного диагноза, эпидемиологического анамнеза, вида материала, даты и времени взятия материала.

Герметично закрытые полиэтиленовые пакеты помещают в термоизолирующий плотно закрывающийся контейнер (термос), приспособленный для транспортирования биологических материалов.

В термоконтейнеры и термосы помещают охлаждающие элементы или пакеты со льдом. К наружной стенке термоконтейнера или термоса прикрепляют этикетку с указанием вида материала, условий транспортирования, названия пункта назначения.

Транспортирование проб клинического материала в референс-лаборатории, лаборатории центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации и лаборатории учреждений противочумной системы Роспотребнадзора осуществляется нарочным(и), информированным о правилах доставки материала в соответствии с п.3.4 СП 1.2.036-95.

# Выделение и идентификация *E. coli* O104:H4 из клинического материала

## Первый день исследований

1) Исследуемый материал засевают на дифференциально-диагностические плотные питательные среды МакКонки и Левина с антибиотиками: цефотаксимом (25 мкг/мл) и налидиксовой кислотой (4 мкг/мл), селективный агар с сорбитолом, а также на жидкие питательные среды: питательную среду для выделения и идентификации энтеробактерий - SDS-бульон, МакКонки-бульон или питательную среду для предварительного обогащения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* - среду N 11 с теми же антибиотиками: цефотаксимом (25 мкг/мл) и налидиксовой кислотой (4 мкг/мл).

Посевы инкубируют при 37 °С в течение 18-24 часов.

Посевы на плотные среды производят таким образом, чтобы получить изолированный рост колоний кишечной палочки.

# Второй день исследований

- 1) Со сред МакКонки и Левина с антибиотиками отсевают по 10 типичных для *E. coli* колоний на отдельные сектора питательного агара (среда N 1-ГРМ, СПА или аналог), разлитого в чашки Петри (по 10 изолятов на одну чашку). Посевы выращивают при 37 °С в течение 18-24 часов.
- 2) Проводят анализ культур, выросших на средах МакКонки и Левина с антибиотиками, на селективном агаре с сорбитолом, с последующей индукцией синтеза веротоксинов на питательном бульоне, содержащем индуктор синтеза веротоксинов - карбадокс, с дальнейшим определением веротоксинов с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов для определения энтерогеморрагических *E. coli*. Подготовку образца для анализа и постановку иммунохроматографического теста проводят в соответствии с инструкцией по применению. При получении положительных результатов в иммунохроматографическом тесте дают предварительный ответ на наличие в исследуемом образце энтерогеморрагических кишечных палочек.
- 3) Проводят анализ культур, выросших на бульоне с антибиотиками, с помощью диагностической мультиплексной ПЦР-тест-системы, предназначенной для индикации клеток штамма *E. coli* O104:H4 по наличию генов *rfb*, *stx2* и *flic*. Подготовку образца для анализа и постановку ПЦР проводят в соответствии с инструкцией по ее применению.  
При получении положительных результатов в ПЦР дают предварительный ответ на наличие в исследуемом образце клеток штамма *E. coli* O104:H4.
- 4) Проводят высев культур микроорганизмов, выросших на SDS-бульоне и других бульонах, на чашки Петри со средами МакКонки и Левина, содержащими цефотаксим (25 мкг/мл) и налидиксовую кислоту (4 мкг/мл), селективный агар с сорбитолом с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии *E. coli*. Посевы выращивают при 37 °С в течение 18-24 часов.

# Третий день исследований.

1) Проводят анализ культур, выросших на средах МакКонки и Левина с антибиотиками, селективном агаре с сорбитолом, с последующей индукцией синтеза веротоксинов на питательном бульоне, содержащем индуктор синтеза веротоксинов - карбадокс и определением веротоксинов с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов для определения энтерогеморрагических *E. coli*. Подготовку образца для анализа и постановку иммунохроматографического теста проводят в соответствии с инструкцией по применению. При получении положительных результатов в иммунохроматографическом тесте дают предварительный ответ на наличие в исследуемом образце энтерогеморрагических кишечных палочек.

2) Используя антительную латексную тест-систему для индикации эшерихий серогруппы O104, в реакции латексной агглютинации (РЛА) среди 20 выросших на питательном агаре изолятов проводят поиск культур серогруппы O104. Постановку РЛА проводят согласно инструкции по ее применению. Давшие положительную реакцию агглютинации с латексным диагностикумом изоляты в этот же день анализируют с помощью мультиплексной ПЦР-тест-системы согласно инструкции по ее применению. Одновременно у культур, которые по результатам РЛА были отнесены к серогруппе O104, изучают биохимические свойства и определяют у них чувствительность к антибиотикам.

3) Проводят пересев 20 типичных для *E. coli* изолятов, выросших на средах МакКонки и Левина с антибиотиками, селективном агаре с сорбитолом (после посева культур со сред обогащения - SDS-бульона и др.), на отдельные сектора чашек Петри с питательным агаром (по 10 изолятов на чашку).

# Четвертый день исследований.

1) В случае, если при положительном иммунохроматографическом тесте, ПЦР-анализе в культурах изолятов, полученных прямым высевом из образца (см. Второй день исследований, п.1) и давших положительную реакцию агглютинации с латексным диагностикумом (см. Третий день исследований, п.1), были обнаружены культуры, продуцирующие веротоксин, или были идентифицированы гены *rfb*, *stx2* и *flic*, специфичные для эпидемического штамма *E. coli* O104:H4, и культуры по своим биохимическим свойствам соответствуют виду *E. coli*, то делают заключение об обнаружении эпидемического штамма *E. coli* O104:H4 в анализируемом образце. В этом случае все дальнейшие исследования образца прекращают, а изолированные культуры *E. coli* O104:H4 пересылают для дальнейшего их изучения в референс-центры по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, референс-центр по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций (ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора) и референс-центр по мониторингу за возбудителями природно-очаговых инфекционных болезней (ФКУЗ "Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока" Роспотребнадзора) (далее референс-центры) с учётом оптимальной транспортной схемы.

В том случае, если ни один из 20 изолятов, полученных при прямом высеве анализируемого материала на среды МакКонки и Левина с антибиотиками, на селективный агар с сорбитолом не дали положительную реакцию на наличие энтеротоксинов, определяемых в экспрессном иммунохроматографическом тесте, не дали положительную реакцию в РЛА и ПЦР-исследовании, работу с этими изолятами прекращают, а их культуры уничтожают.

2) Продолжают работать с 20 изолятами, полученными со сред обогащения (см. Третий день исследований, п.1). У изолятов определяют наличие веротоксинов после инкубации на питательном бульоне, содержащем индуктор синтеза веротоксинов - карбадокс (и далее тестируют с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов, изучают серологические свойства в РЛА, предназначенной для идентификации серо- группы *E. coli* O104).

В случае обнаружения изолятов, давших положительную реакцию на наличие веротоксинов в иммунохроматографическом тесте, положительную реакцию агглютинации в РЛА, их анализируют в ПЦР для обнаружения в геноме исследуемых изолятов специфических для *E. coli* O104:H4 генов *rfb*, *stx2* и *flic*. У этих же изолятов изучают биохимические свойства и чувствительность к антибиотикам.

# Пятый день исследований.

1) В случае, если при ПЦР-анализе в культурах изолятов, давших положительную реакцию агглютинации с латексным диагностикумом, были идентифицированы гены *rfb*, *stx2* и *flic*, специфичные для штамма *E. coli* O104:H4, а культуры по своим биохимическим свойствам соответствуют виду *E. coli*, то делают заключение об обнаружении эпидемического штамма *E. coli* O104:H4 в анализируемом образце.

В этом случае все дальнейшие исследования образца прекращают, образец уничтожают, а изолированные культуры *E. coli* O104:H4 пересылают для дальнейшего их изучения в референс-центры.

В том случае, если ни одна из 20 культур, полученных со сред обогатления, не была отнесена к серогруппе O104, работу с этими изолятами прекращают, а их культуры уничтожают.

Делается заключение об отсутствии в исследуемом материале эпидемического штамма *E. coli* O104:H4.

# Выделение и идентификация E. coli O104:H4 из пищевых продуктов

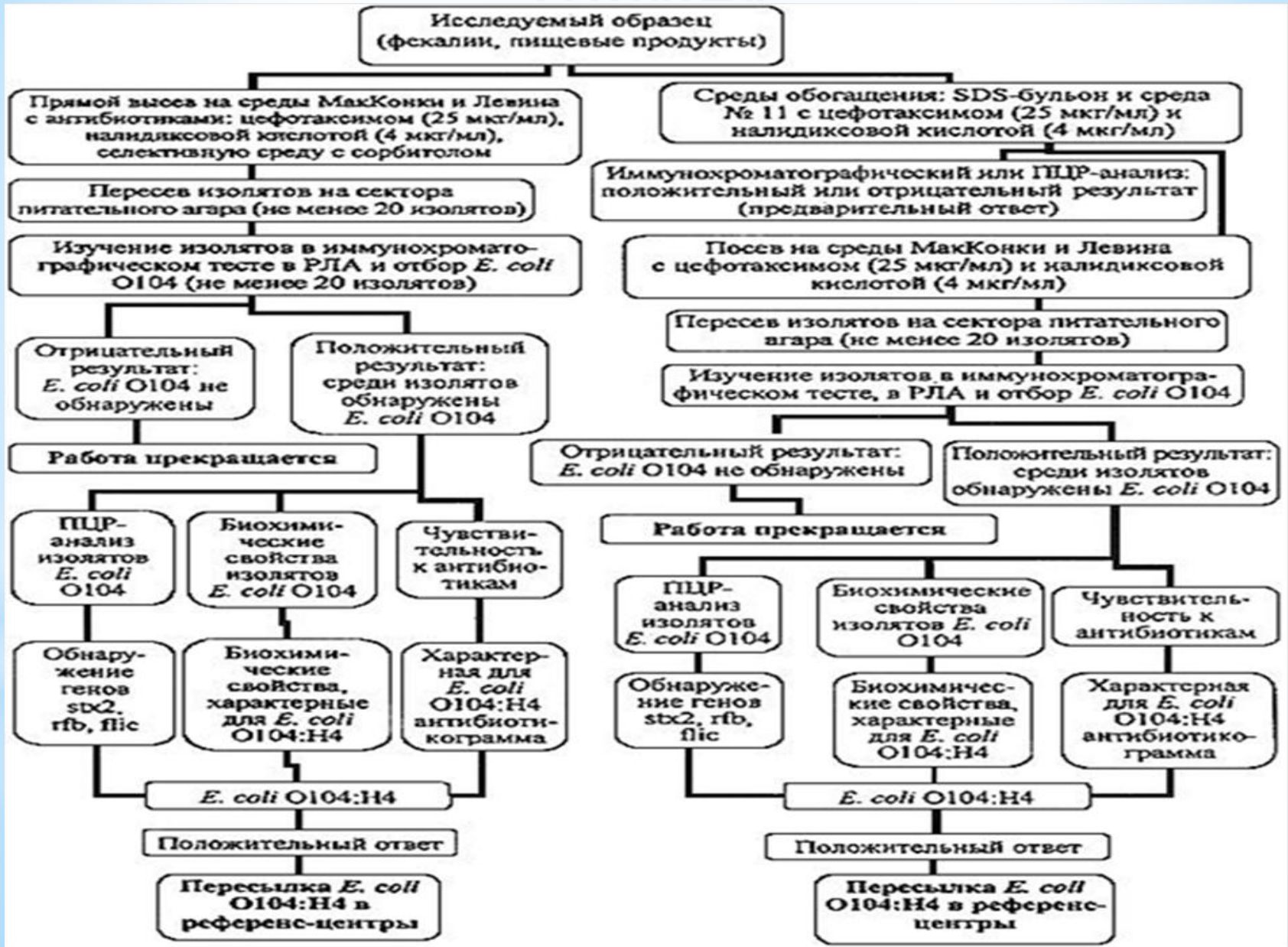
Взятие материала и пересылка его для лабораторного исследования

При отборе и подготовке образцов различных видов пищевых продуктов к исследованию руководствуются МУК 4.2.2872-11 "Методы выявления и идентификации патогенных бактерий - возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией".

Исследование материала

Выделение культур E. coli O104:H4 из исследуемых образцов пищевых продуктов и их последующую идентификацию с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов на веротоксины, реакции латексной агглютинации (РЛА) и мультиплексной ПЦР, определение биохимических свойств и чувствительности культур к антибиотикам проводят по той же схеме, как и в случае исследования клинических образцов.

# Схема выделения и идентификации *E. coli* O104:H4





# Выделение и идентификация E. coli O157:H7/O157:H- из клинического материала

Первый день исследований.

1) Исследуемый материал засевают на среду для выделения и дифференциации E. coli O157:H7/O157:H- - Сорбитол-E. coli O157:H7-агар или МакКонки-сорбитол-агар и параллельно на обычный агар Эндо или МакКонки-агар, а также на жидкие питательные среды - SDS-бульон и др.

Прямой высеv анализируемого образца на Сорбитол-E. coli O157:H7-агар или идентичные среды необходимо производить не менее чем на три чашки Петри с таким расчетом, чтобы на пластинках среды выростали десятки, сотни изолированных колоний микроорганизмов. Получение большого количества колоний на дифференциальной среде повышает вероятность обнаружения и выделения серовара E. coli O157:H7/O157:H-.

Посевы инкубируют при 37 °C в течение 18-24 часов.

# Второй день исследований.

1) Среди выросших колоний на Сорбитол-Е. coli O157:H7-агаре отбирают неокрашенные сорбитолнегативные колонии, характерные для E. coli O157:H7, и засевают их на отдельные сектора в чашки Петри с питательным агаром. При наличии большого количества неокрашенных колонии необходимо отсеять не менее 20 изолятов (по 10 на чашку). Посевы выращивают при 37 °С в течение 18-24 часов.

2) С помощью иммунохроматографических экспресс-тестов определения E. coli O157:H7/O157:H- или иммунохроматографических экспресс-тестов для определения энтерогеморрагических E. coli проводят анализ культур, выросших на твердых питательных средах. Подготовку образца для анализа и постановку иммунохроматографических экспресс-тестов проводят в соответствии с инструкцией по их применению.

3) С помощью мультиплексной ПЦР (набор "ТЭК-О157" или аналоги), предназначенной для индикации клеток E. coli O157:H7/O157:H- по наличию в них генов rfb, eae, stx1, stx2 (или только stx1 или stx2), проводят анализ смеси культур, выросших на SDS-бульоне или других жидких средах. Подготовку образца для анализа и постановку ПЦР проводят в соответствии с инструкцией по ее применению.

При получении положительных результатов иммунохроматографических экспресс-тестов или в ПЦР-исследовании дают предварительный ответ на наличие в исследуемом образце клеток энтерогеморрагического серовара E. coli O157:H7/O157:H-.

4) Проводят пересев культур микроорганизмов, выросших на жидких средах, на чашки Петри со средой Сорбитол-Е. coli O157:H7-агар (по три чашки из каждой среды) с таким расчетом, чтобы получить десятки и сотни изолированных колоний микроорганизмов. Посевы выращивают при 37 °С в течение 18-24 часов.

# Третий день исследований.

1) Используя иммунохроматографические экспресс-тесты определения *E. coli* O157:H7/O157:H-, антительную латексную тест-систему для индикации *E. coli* серогруппы O157, в реакции латексной агглютинации (РЛА) среди выросших на питательном агаре изолятов, полученных из неокрашенных сорбитолнегативных колонии (взятых после прямого посева образца с Сорбитол-*E. coli* O157:H7-агара), проводят поиск культур *E. coli* серогруппы O157. Постановку РЛА проводят согласно инструкции по ее применению (см. прилож.8). Давшие положительную реакцию в иммунохроматографических экспресс-тестах определения *E. coli* O157:H7/O157:H- или реакции агглютинации с латексным диагностикумом культуры в этот же день анализируют с помощью мультиплексной ПЦР-тест-системы. Одновременно у культур, которые по результатам РЛА были отнесены к серогруппе O157, изучают биохимические свойства.

2) Производят пересев сорбитолнегативных неокрашенных колоний, выросших на Сорбитол-*E. coli* O157:H7-агаре или идентичных средах (после пересева культур со сред обогащения), на отдельные сектора пластинок питательного агара, разлитого в чашки Петри. При наличии на Сорбитол-*E. coli* O157:H7-агаре большого количества сорбитолнегативных колоний необходимо отсеять для последующих исследований не менее 20 изолятов (по 10 колоний на чашку).

# Четвертый день исследований.

1) В случае, если при ПЦР-анализе в культурах изолятов, выделенных прямым высевом анализируемого образца на Сорбитол-Е. coli O157:H7-агар и давших положительную реакцию в иммунохроматографических экспресс-тестах для определения E. coli O157:H7/O157:H- или агглютинации с латексным диагностикумом, были идентифицированы гены rfb, eae, stx1 и stx2 (или только stx1 или stx2), специфичные для серовара E. coli O157:H7/O157:H-, и культуры по своим биохимическим свойствам соответствуют виду E. coli, то делают заключение об обнаружении в анализируемом материале клеток энтерогеморрагического серовара E. coli O157:H7/O157:H-. В этом случае все дальнейшие исследования образца прекращают, а изолированные культуры E. coli O157:H7/O157:H- пересылают для дальнейшего их изучения в референс-центры.

В том случае, если ни один из изолятов, полученных при прямом высеве анализируемого материала на Сорбитол-Е. coli O157:H7-агар, не дал положительную реакцию в иммунохроматографических экспресс-определениях E. coli O157:H7/O157:H- или РЛА, работу с этими изолятами прекращают, а их культуры уничтожают.

2) У сорбитолнегативных изолятов, полученных со сред обогашения (см. Третий день исследований, п.2), определяют принадлежность к E. coli O157:H7/O157:H- на иммунохроматографических экспресс-тестах, изучают серологические свойства в РЛА, предназначенной для идентификации E. coli серогруппы O157.

В случае обнаружения изолятов, давших положительную реакцию на иммунохроматографических экспресс-тестах, положительную реакцию агглютинации в РЛА, их анализируют в ПЦР для обнаружения в их геноме специфических для E. coli O157:H7/O157:H- генов rfb, eae, stx1 и stx2 (или только stx1 или stx2). У этих же изолятов изучают биохимические свойства.

# Пятый день исследований.

1) В случае, если при ПЦР-анализе в культурах изолятов, давших положительную реакцию на иммунохроматографических экспресс-тестах, положительную реакцию агглютинации с латексным диагностикумом, были идентифицированы гены *rfb*, *eae*, *stx1*, *stx2* (или только *stx1* или *stx2*), специфичные для *E. coli* O157:H7/O157:H-, и культуры по своим биохимическим свойствам соответствуют виду *E. coli*, то делают заключение об обнаружении штамма *E. coli* O157:H7/O157:H- в анализируемом образце.

В этом случае все дальнейшие исследования образца прекращают, образец уничтожают, а изолированные культуры *E. coli* O157:H7/O157:H- пересылают для дальнейшего их изучения в референс-центры.

В том случае, если ни один из изолятов, полученных со сред обогатления, не был отнесен к серогруппе O157, работу с этими изолятами прекращают, а их культуры уничтожают.

Делается заключение об отсутствии в исследуемом материале бактерий энтерогеморрагического серовара *E. coli* O157:H7/O157:H-.

# Выделение и идентификация E. coli O157:H7/O157:H- из пищевых продуктов

Взятие материала и подготовка его для лабораторного исследования

При отборе и подготовке образцов различных видов пищевых продуктов к исследованию руководствуются МУК 4.2.2872-11 "Методы выявления и идентификации патогенных бактерий - возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией", МУК 4.2.992-00 "Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки E. coli O157:H7" и МУ N 04-723/3 от 17.12.84 "Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями".

## Исследование материала

Выделение культур E. coli O157:H7/O157:H- из исследуемых образцов и их последующую идентификацию с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов, реакции латексной агглютинации (РЛА) (для обнаружения серогруппы O157) и мультиплексной ПЦР-тест-системы, определение биохимических свойств культур проводят по той же схеме, как и в случае исследования клинических образцов.



# Выделение и идентификация E. coli, "не относящихся к E. coli O157:H7", из клинического материала

## Исследование материала

Первый день исследований.

1) Исследуемый материал засевают на три чашки Петри с питательной средой для выделения энтеробактерий - агар Эндо, селективный агар МакКонки с сорбитолом, среда Левина с антибиотиками и на среды для предварительного обогащения энтеробактерий - SDS-бульон, МакКонки-бульон или среду N 11.

Высев материала на дифференциально-диагностические плотные среды производят с таким расчетом, чтобы в каждой чашке или в сумме на трех чашках получить не менее 100 изолированных колоний энтеробактерий.

Посевы выращивают при 37 °С в течение 18-24 часов.



# Второй день исследований.

1) Просматривают результаты посевов на дифференциально-диагностических средах и оценивают морфологию выросших изолированных колоний энтеробактерий (определяют морфотип колоний). Затем на чашки Петри с питательным агаром засевают по три-пять колоний каждого морфотипа (на отдельные сектора среды). Число отсеянных изолятов при любом количестве морфотипов не должно быть менее 20. Посевы выращивают при 37 °С в течение 18-24 часов.

2) Проводят анализ культур, выросших на средах МакКонки и Левина с антибиотиками, селективном агаре МакКонки с сорбитолом, с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов для определения энтерогеморрагических *E. coli*. Подготовку образца для анализа и постановку иммунохроматографического теста проводят в соответствии с инструкцией по применению (см. прилож.2).

3) Используя мультиплексную ПЦР-тест-систему, проводят анализ смеси культур энтеробактерий, выросших на жидких накопительных средах (SDS-бульон, среда N 11), на присутствие в них энтерогеморрагических эшерихий, "не относящихся к *E. coli* O157:H7". Идентифицируют такие эшерихии на основании обнаружения в смеси энтеробактерий генов *eae*, *stx1*, *stx2* (или только *stx1* или *stx2*). Ген *rfb*, определяющий синтез антигена O157, в этой группе патогенов не обнаруживается. Следует также учитывать, что в отдельных случаях у энтерогеморрагических культур, "не относящихся к *E. coli* O157:H7", может не обнаруживаться и ген *eae*.

При получении положительных результатов иммунохроматографических экспресс-тестов для определения энтерогеморрагических *E. coli*, в ПЦР (обнаружение генов *eae*, *stx1*, *stx2*) дают предварительный ответ на наличие в исследуемом образце клеток энтерогеморрагических эшерихий, "не относящихся к *E. coli* O157:H7".

4) Производят высев культур энтеробактерий, выросших на жидких накопительных средах (SDS-бульон, среда N 11 или аналоги), на чашки Петри со средой Эндо, МакКонки-агаром с сорбитолом (не менее чем на три чашки с каждой среды обогащения) с таким расчетом, чтобы получить не менее 100 изолированных колоний микроорганизмов. Посевы выращивают при 37 °С в течение 18-24 часов.

# Третий день исследований.

1) С помощью ПЦР-исследований проводят анализ 3-5 смешанных в одной пробирке изолятов энтеробактерий каждого морфотипа, отобранного при прямом высеве исследуемого материала (см. Второй день исследований, п.1). Для получения более объективных результатов анализа, при любом количестве отобранных морфотипов число изучаемых в ПЦР изолятов должно быть не менее 20.

Результатами ПЦР-анализа смеси изолятов могут быть:

- а) в смеси изолятов обнаруживают гены *eae*, *stx1*, *stx2*;
- б) в смеси изолятов обнаруживают *eae*-ген и один из *stx*-генов;
- в) в смеси изолятов обнаруживают только *stx1*- и *stx2*-гены (или один из них) и не обнаруживают ген *eae*.

При обнаружении в смеси изолятов одной из перечисленных выше комбинаций генов проводят дополнительную ПЦР с каждым из входящих в смесь трех-пяти изолятов. У каждого изолята, давшего положительную ПЦР, определяют биохимические свойства для подтверждения принадлежности его к виду *E. coli*.

2) Просматривают результаты посевов со сред накопления на среду Эндо (см. Второй день исследований, п.3) и оценивают морфологию изолированных колоний энтеробактерий. Затем по три-пять колоний бактерий каждого морфотипа засевают на отдельные сектора питательного агара в чашках Петри. Число отсеянных изолятов, независимо от количества выявленных среди колоний морфотипов, должно составлять не менее 20. Посевы выращивают при 37 °С в течение 18-24 часов.

3) Проводят анализ культур, выросших на средах МакКонки и Левина с антибиотиками, с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов для определения энтерогеморрагических *E. coli*. Подготовку образца для анализа и постановку иммунохроматографического теста проводят в соответствии с инструкцией по применению.

# Четвертый день исследований.

1) Учитывают результаты изучения биохимических свойств изолятов, у которых с помощью ПЦР были обнаружены специфические для энтерогеморрагических эшерихий гены *eae*, *stx1*, *stx2* (или только один из генов шига-токсинов) (см. Третий день исследований, п.1). В случае, если изолят по своим биохимическим свойствам соответствует виду *E. coli*, делают заключение о присутствии в анализируемом образце энтерогеморрагических эшерихий, "не относящихся к *E. coli* O157:H7".

В том случае, если изолят по своим биохимическим свойствам соответствует виду *E. coli*, определяется положительный результат в иммунохроматографическом экспресс-тесте для определения энтерогеморрагических *E. coli*, но с помощью ПЦР в культуре не обнаружен ген *eae*, а присутствуют лишь гены шига-токсинов, делают заключение о присутствии в анализируемом образце шига-токсинпродуцирующих эшерихий (STEC-культур).

При обнаружении в образце энтерогеморрагических изолятов эшерихий или STEC-изолятов, исследования прекращают, а выделенные культуры направляют в референс-центры для дальнейшего изучения.

Если у изученных штаммов с помощью ПЦР-исследований обнаружены гены *eae*, *stx1*, *stx2* или же эти гены в разной комбинации, но изоляты по своим биохимическим свойствам не могут быть отнесены к виду *E. coli*, делают заключение об отсутствии в исследуемом образце энтерогеморрагических или STEC-культур. Выделенные культуры с генами *eae*, *stx1*, *stx2*, но не относящиеся к виду *E. coli*, также направляют в референс-центры.

2) Если в четвертый день исследований по п.1 получены отрицательные результаты, продолжают поиск энтерогеморрагических эшерихий или STEC-культур среди изолятов энтеробактерий, выделенных из сред обогачения (см. Третий день исследований, п.2).

Изучение изолятов в ПЦР проводят по той же схеме, как это описано выше (см. Четвертый день исследований, п.1). Если в результате проведенного анализа идентифицированы культуры энтеробактерий с генами *eae*, *stx1*, *stx2*, изучают их биохимические свойства.

# Пятый день исследований.

1) Учитывают результаты изучения биохимических свойств изолятов энтеробактерий с генами *eae*, *stx1*, *stx2*. В случае, если эти изоляты по биохимическим свойствам относятся к виду *E. coli*, то делают положительное заключение о наличии в исследуемом образце энтерогеморрагических эшерихий или STEC-культур.

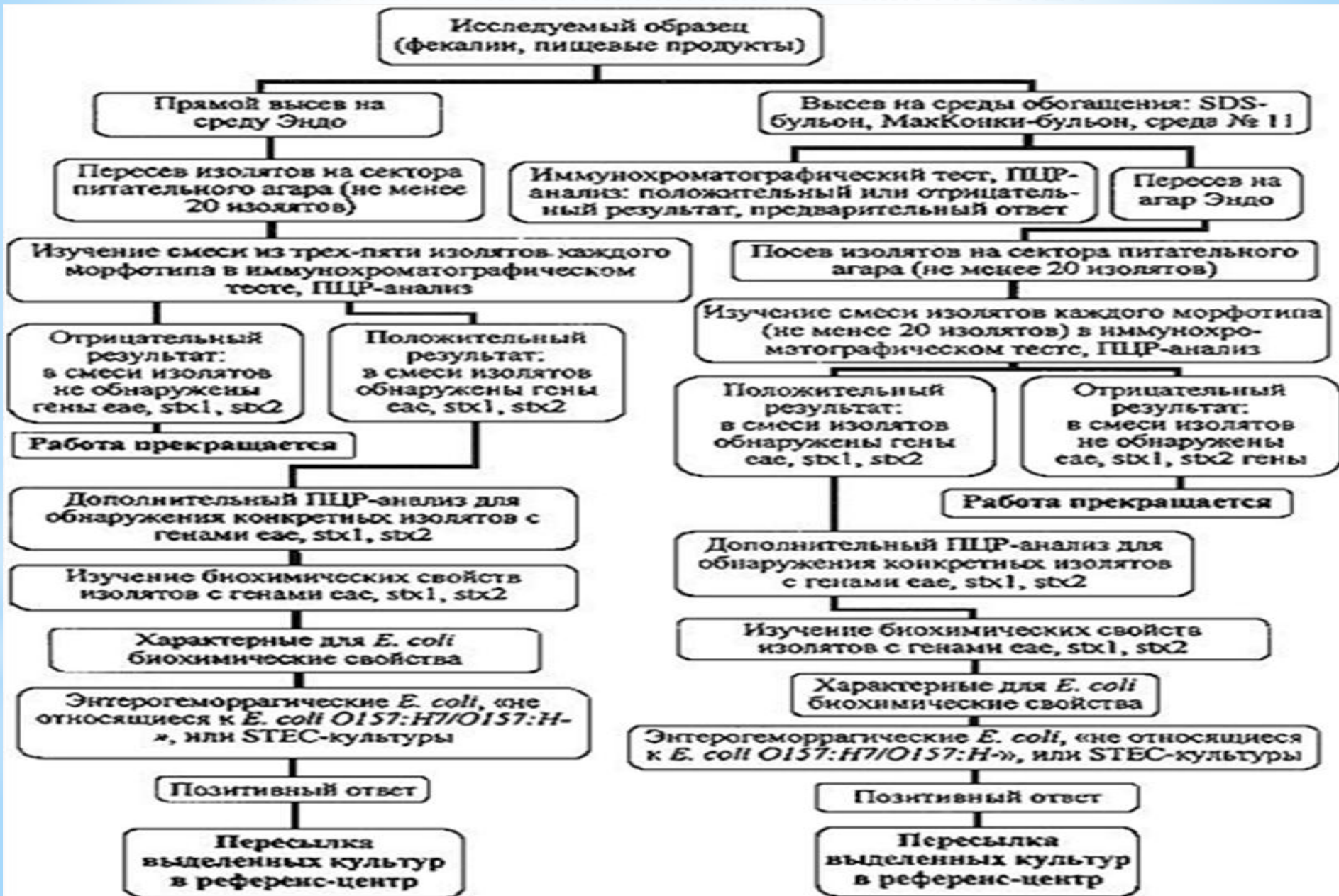
Выделенные культуры направляют в референс-центры.

# Выделение и идентификация E. coli, "не относящихся к E. coli O157:H7", из пищевых продуктов

## Исследование материала

Выделение энтерогеморрагических культур E. coli, "не относящихся к E. coli O157:H7", из исследуемых образцов и их последующую идентификацию в иммунохроматографических экспресс-тестах, с помощью мультиплексной ПЦР и определения биохимических свойств культур проводят по той же схеме, как и в случае исследования клинических образцов.

# Схема выделения и идентификации энтерогеморрагических эшерихий, "не относящихся к E. coli O157:H7"



**Благодарю за внимание.**