ГОСУДАРСТВЕННОЕ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ НОРМИРОВАНИЕ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СБОРНИК

МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЗАКОНА ОТ 12.06.08 №88-ФЗ

«Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 1

МОСКВА 2009

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 1

ББК 51.23
С23

С23 **Сборник** методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию».—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—79 с.

ISBN 5—7508—0771—1

В сборник включены методические документы, содержащие правила и методы исследований (испытаний) и измерений, а также правила отбора образцов для проведения исследований (испытаний) и измерений, в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г Г Онищенко от 08 12 2008 № 67

ББК 51.23

Технический редактор Г. И Климова

Подписано в печать 18 02 09

Формат 60x88/16 Печ л 5,0

Тираж 200 экз Заказ 11

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер , д 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш , 19а
Отделение реализации, тел /факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач Российской
Федерации – Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
4 ноября 2000 г.
Дата введения: 4 февраля 2001 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Методические указания
МУК 4.2.992—00

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 выде-

ления 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. Оболенск 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, сырья, 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. № 5487—1.

3.2. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52 ФЗ.

3.3. СанПиН 2 3.2.560—96 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов»

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. 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 acc. to HAJNA (Cat. № 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 час проводят высев 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. № 1.04036); Sorbitol MacConkey Agar (SMAC-agar) Cat. № 1.09207; Fluorocult® HC Agar acc. to SZABO Cat. № 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, Lac^+
Сорбитол E. coli O157 : H7 агар	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, бесцветные, прозрачные. Могут быть бледно-розовые со светлым ореолом, мутноватые
Fluorocult E. coli 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, Lac^+
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 H_2S), 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» им 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 O 157 : 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

№	Тест или субстрат	Наименование штаммов	
		E. coli O157 : H7	E. coli
1	2	3	4
1	Сорбитол	–	+
2	β-D-глюкуронидаза	–	+
3	Цитрат Симмонса	–	–
4	Мочевина	–	–
5	Малонат натрия	–	–
6	Сероводород	–	–
7	Фенилаланиндезаминаза	–	–
8	Ацетат натрия	+	+
9	Рамноза	±	±
10	Глюкоза (газ)	+	+
11	Лактоза	+	±
12	Сахароза	±	±

Продолжение табл. 3

1	2	3	4
13	Маннит	+	+
14	Арабиноза	+	+
15	Адонит	–	–
16	Инозит	–	–
17	Салицин	– (±)	±
18	Дульцит	– (±)	±
19	Раффиноза	±	±
20	Ксилоза	+	±
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 Ridasckeen «Веротоксин» (фирма «Biopharm», 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, сенсибилизованные специфическими антителами против VT1 и VT2, реагируют с веротоксином образца, что приводит к агглютинации. Комплекс AG+AT диффузно осаждается 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 бактери-

альные 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 час. 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 агаризированная среда Brain-heart infusion broth (BHI), Cat. № 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/см^3, 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. № R-5701 и C-2201, фирма «Biopharm», Германия). В основе процедуры лежит взаимодействие антигенов с антителами. Поставляемый в комплекте набора планшет сенсибилизирован 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, питатель-

ные 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 аорфинитетом 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 ± 5)°С	ТУ 64—1—28—70—76
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 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
Микроскоп биологический МБИ–1, МБИ–2, МБИ–3, МБР–1, МБР–3	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89 Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с ГОСТ 6709—72	
Центрифуга медицинская с числом оборотов не менее 3000 об/мин	
Аппарат для ультразвуковой терапии УЗТ–101–Ф	Завод электромедицинской аппаратуры (ЭМА), г. Москва
Анализатор иммуноферментный	
Дозаторы пипеточные одноканальные ДП–1–1000	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145—84
Штативы для пробирок	
Электроплитка	ГОСТ 14919—83

10.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Бутылки стеклянные для химических реактивов	

Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Кастрюли эмалированные	ГОСТ 24778—81
Марля медицинская	ОСТ 9412—93
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ОСТ 25336—82
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки Уленгута (поплавки)	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Ступка фарфоровая с пестиком	ГОСТ 9147—80
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С, с ценой деления шкалы 1 °С	ГОСТ 13646—68
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*)
Триптозный ГРМ-агар и ГРМ-бульон	по заказу экспериментальными сериями (ГНЦ ПМ)
Сахароза	ГОСТ 5833—75
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Соль Мора	ГОСТ 4208—72
Панкреатический гидролизат казеина	ТУ 9385—002—00479327—94 (ГНЦ ПМ); ФС 42—3440—97 (АООТ «Биомед»**)
Сорбитол	
Сухой питательный бульон (ГРМ-бульон)	ФС 42—3378—97 (ГНЦ ПМ)
Среда Клиглера	ФС42—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)

---

* Производитель – Государственный научный центр прикладной микробиологии, отделение «Питательные среды» (г. Оболенск, Серпуховского района, Московской области)

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

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. № 1.04036 (фирма «MERCK», Германия)
Fluorocult® HC Agar acc. to SZABO	Cat. № 1.09206 (фирма «MERCK», Германия)
Sorbitol MacConkey Agar (SMAC Agar)	Cat. № 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. № 51009 (фирма «BioMerieux», Франция)
GN Enrichment Broth acc. to HAJNA (грамнегативный бульон по Хайну)	Cat. № 1.10756 (фирма «MERCK», Германия), Cat. № M 242 (фирма «Ni Media», Индия)
Среда Кесслера сухая	ФС 42—0024—00
Трипказо-соевый бульон	Cat. № 51019 (фирма «BioMerieux», Франция)

Диагностикумы, сыворотки

Набор Ridascheen «Веротоксин»	Cat. № R—5701 (фирма «Biopharm», Германия)
Набор Ridascheen «Веротоксин»	Cat. № C—2201 (фирма «Biopharm», Германия)
Набор реагентов «Verotox-F» для определения веротоксинов методом обращенной пассивной латексной агглютинации (РОПЛА)	Cat. № 342101 (фирма «Seiken», Япония)
Сыворотки диагностические эшерихиозные О157 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 $см^3$ 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 (Na_2HPO_4) и 0,45 г калия фосфорнокислого однозамещенного (KH_2PO_4) растворяют в 1 $дм^3$ (1000 $см^3$) 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 фосфорно-кислый 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 pH до 7,8—8,0 Стерилизуют при (112 ± 1)°С в течение 30 минут. После стерилизации pH=7,6—7,8.

10.4.1.4. Раствор бриллиантового зеленого концентрацией 5 $г/дм^3$ (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 $см^3$ 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 pH = 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 $см^3$ в стерильные пробирки с поплавками или по 100 $см^3$ 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 pH = 7,3 ± 0,2.

Среду разливают по 10 $см^3$ в пробирки с поплавками или в колбы по 100 $см^3$ и стерилизуют при температуре (115 ± 1)°С в течение 20 минут

10.4.2.3. Сердечно-мозговой бульон (BHI), Cat № 51009, фирма «BioMerieux», Франция

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

10.4.2.4. Грам-негативный бульон по Хайну (GN Enrichment Broth acc to HAJNA), Cat № 10756, фирма «MERCK», Германия (или Cat № M 242, фирма «Ni Media», Индия)

Готовится по прописи, указанной на этикетке.

10.4.2.5. Трипказо-соевый бульон (Cat. № 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. Триптозный ГРМ-агар

10.4.2.14. Триптозный ГРМ-бульон

10.4.2.15. Среда Олькеницкого

Содержание

Методика выполнения измерений массовой доли свинца и кадмия в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии: МУК 4.1. 986—00 3

Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки E coli O157 : H7: МУК 4,2.992—00 33

Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах: МУК 4.2.999—00 55

Определение массовой концентрации аверсектина С в органах и тканях животных, плазме и молоке методом флуоресцентной высокоэффективной жидкостной хроматографии МУК 4.1.1012—01 69

gost.e-ecolog.ru