

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра  
здравоохранения-  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь



В.И.Качан

2009 г.

Регистрационный № 026-0309

Инструкция по применению  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА  
ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЯМИ

Учреждения-разработчики: ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»

Авторы: Нараленков В.А., Титов Л.П., Шитикова П.В.,  
Науменко Е.М., Можейко А.Б., Ермакова Т.С.,  
Газиумарова Л.Д., Паньшина Е.Ф.

Минск - 2009

## ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению предназначена для специалистов органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, других организаций здравоохранения, организаций любых организационно-правовых форм собственности.

2. В настоящую инструкцию по применению включены методы классической микробиологической диагностики заболеваний человека, вызываемых энтеробактериями, ускоренные методы идентификации и выявления антигенов энтеробактерий, а также методы серологической диагностики соответствующих заболеваний и сведения о приготовлении ряда необходимых питательных сред.

3. Настоящая Инструкция по применению преследует цель унификации методов проведения лабораторной диагностики с применением современных приемов, позволяющих идентифицировать любые из известных в данное время представителей энтеробактерий. В настоящей инструкции по применению представлены сведения по определению эпидемических маркеров (далее – эпидмаркеры) штаммов энтеробактерий. Внедрение в практику настоящей инструкции по применению будет способствовать повышению уровня микробиологической диагностики в Республике Беларусь.

## ГЛАВА 2 КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

4. Определение таксономических категорий в бактериологии основано на сочетании морфологических, тинкториальных, биохимических, генетических и других биологических характеристик.

5. Семейство *Enterobacteriaceae* объединяет обширную группу грамотрицательных палочек подвижных или неподвижных, образующих или не образующих капсулы, не кислотоустойчивых, не образующих спор, аэробов или факультативных анаэробов. Они образуют кислоту при ферментации глюкозы, цитохромоксидазоотрицательны, восстанавливают нитраты до нитритов (кроме некоторых штаммов *Erwinia*). Классификация семейства *Enterobacteriaceae* приведена в приложении 1 к настоящей инструкции по применению

## ГЛАВА 3 ОТБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА, ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

6. Микробиологическому исследованию на наличие энтеробактерий может быть подвергнут различный материал, получаемый от людей; показания к его исследованию, правила взятия, подготовка к посеву и выбор питательных сред различны. Начиная с отбора колоний на пластинчатых средах, последующие этапы микробиологического исследования (определение родовой, видовой принадлежности выделенных культур, их серологических характеристик и др.) идентичны. Схема микробиологического исследования на энтеробактерии приведена в при-

ложении 2 к настоящей Инструкции по применению.

7. Обоснованные показания к проведению микробиологического исследования того или иного материала и правильное его взятие в значительной мере определяют эффективность действий врача-бактериолога микробиологической лаборатории. В определении характера подлежащих исследованию материалов, сроков их взятия ведущее значение принадлежит врачам лечебно-профилактических организаций (далее – ЛПО) и врачам-эпидемиологам территориальных органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор. Показания к микробиологическим исследованиям различного клинического материала приведены в приложении 3 к настоящей Инструкции по применению.

Повышению высеваемости, в частности патогенных энтеробактерий, способствуют повторное (до 3-4 раз) исследование соответствующего материала.

8. Общим требованием к процедуре отбора проб клинических материалов является обеспечение условий, исключающих контаминацию (загрязнение) материала микроорганизмами из смежных областей тела и окружающей среды. Материал для микробиологического исследования целесообразно брать до начала антибиотикотерапии. Судна, горшки и другие емкости для сбора испражнений должны быть тщательно вымыты и лишены следов дезинфицирующих средств.

9. Материал собирают в стерильную посуду, снабжают наклейкой с указанием фамилии обследуемого и наименования материала. В сопроводительном документе указывают организацию, направляющую материал, анкетные данные обследуемого: фамилия, имя, отчество, возраст, место работы и должность (для детей, посещающих учреждения образования указывают название соответствующего учреждения). Дату заболевания, диагноз или другие показания для обследования; наименование материала, дату и час взятия пробы, цель исследования, первичность или повторность исследования (при повторных исследованиях необходимо указать дату и результат первичного обследования), фамилию и должность лица, направляющего материал.

10. Испражнения собирают сразу после дефекации из судна, горшка, специального лотка или с пеленки с помощью стерильной стеклянной палочки, проводочной петли или деревянного шпателя. При наличии в испражнениях патологических примесей (слизь, хлопья, гной) их следует включать в отбираемую пробу. Испражнения можно получить непосредственно из прямой кишки с помощью ректальных тампонов, ватных или ватномарлевых, укрепленных на металлической петле или деревянной палочке.

При профилактических обследованиях здоровых лиц на носительство сальмонелл возможно применение солевого слабительного (25-30 г магнезии сульфата –  $MgSO_4$ ) в теплом виде и предпочтительно накануне дня взятия испражнений на исследование.

Испражнения, не помещенные в консервант, суспендируют в изотоническом растворе хлорида натрия (далее – ИХН) в соотношении 1:5 или 1:10 и засевают не позднее 2 часов после взятия. При использовании консервантов оптимальны те же сроки (не позднее 2 часов после взятия), но материал пригоден для исследования еще в течение 12-24 часов. Объем испражнений, вносимых в консервант, не должен превышать 1/3 его объема, после внесения в пробирку, ис-

пражнения следует перемешать. Материал, помещенный в консервант, сохраняют до начала исследования при температуре +4-6 °С.

В качестве консервантов (транспортных сред) используют забуференный глицериновый, фосфатно-буферный консерванты (рН 8,0), а также ИХН. При исследованиях на наличие иерсиний глицериновый консервант не пригоден. По возможности исследуемый материал сохраняют при температуре +4-6 °С, вплоть до учета результатов посевов на пластинчатые среды, а при целенаправленном исследовании на иерсинии – до 14 дней (с целью накопления). Наиболее универсальным консервантом является среда Кэри-Блэр.

11. Кровь для исследования берут стерильным шприцом с соблюдением правил асептики из локтевой вены. У взрослых забирается в количестве не менее 10 мл, у детей не менее 5 мл, у новорожденных 1-2 мл и засевают у постели больного в соотношении 1:10 во флаконы со средой Раппопорт, 10-20% желчным бульоном или в стерильную дистиллированную (водопроводную) воду. Использование сред с желчью предпочтительно. При взятии крови в более поздние сроки и при слабо выраженной клинической картине заболевания объем засеваемой крови увеличивают до 15-20 мл, сохраняя то же соотношение крови и питательной среды (1:10). У детей до 1 года кровь берут из пальца, пятки или мочки уха, с соблюдением правил асептики.

При необходимости исследованию могут быть подвергнуты сгустки крови (после отделения сыворотки), доставленной в лабораторию для серологических исследований. Сгусток крови измельчают в пробирке с помощью стеклянной палочки и засевают (в соотношении 1:10) в среду Раппопорт или желчный бульон.

12. Рвотные массы и промывные воды желудка берут для исследования в объеме 100 мл. При кислой реакции рвотные массы перед посевом нейтрализуют 10% стерильным раствором натрия гидрокарбоната ( $\text{NaHCO}_3$ ). Исследованию подлежат первые порции промывных вод. Перед посевом промывные воды центрифугируют и высевают их осадок.

13. Соскоб розеол исследуют при наличии хорошо выраженных розеол. Участок кожи над ними обрабатывают спиртом, промывают стерильным ИХН, осушают стерильной марлей и подвергают скарификации. На поврежденную кожу наносят 1-2 капли желчного бульона или ИХН, затем собирают материал пастеровской пипеткой или небольшим кусочком стерильной ваты и опускают в пробирку с желчным бульоном.

14. Желчь (дуоденальное содержимое) получают путем зондирования. Материал собирают в 3 стерильные пробирки, по порциям А, В, С, соответственно – дуоденальное содержимое, пузырьную желчь и желчь из желчных протоков. Дуоденальное содержимое и желчь имеют зеленовато-желтый цвет, щелочную реакцию (последнюю проверяют индикаторными бумажками.). Кислая реакция, белесоватый оттенок жидкости, наличие хлопьев свидетельствуют о примеси желудочного сока, такой материал не пригоден для исследования на наличие энтеробактерий.

15. Моча. После обмывания наружных половых органов и спуска начальной порции мочи собирают 20-30 мл мочи в стерильный флакон. Доставленную в лабораторию мочу перед посевом центрифугируют и засевают осадок, или используют для посева нативную мочу. Пробы мочи могут храниться до

начала исследования не более 1-2 часов при комнатной температуре и не более суток в холодильнике.

16. Гной, пунктаты органов, экссудат получают с помощью стерильного шприца, ватного или марлевого тампона, при возможности сразу засевают на соответствующие питательные среды или пересылают в стерильных пробирках в лабораторию.

17. Слизь из зева, носа, уха, отделяемое шейки матки забирают с помощью стерильного ватного или марлевого тампона, помещают в пробирки с ИХН, слабощелочным питательным бульоном (далее - СПБ), или без них и пересылают в лабораторию.

18. Операционный материал (кусочки органов и тканей, извлекаемых при оперативных вмешательствах, содержимое удаленного червеобразного отростка, желчного, мочевого пузыря и др.) помещают в стерильные стеклянные баночки или пробирки, отдельные для каждого вида материала и доставляют в лабораторию, следуя общим правилам.

19. Спинномозговую жидкость получают при люмбальной пункции в объеме 3-5 мл и помещают в стерильную пробирку. При транспортировке предохраняют от охлаждения. Люмбальную пункцию проводить только при наличии клинических показаний.

20. Секционный материал берут на месте вскрытия, соблюдая правила асептики. В лабораторию направляют участки кишки длиной 8-10 см, с целью получения которых с обоих концов намеченного участка накладывают двойные лигатуры и разрезают кишку между этими лигатурами. Кровь из сердца или синуса твердой мозговой оболочки и желчь из желчного пузыря берут в объеме 8-5 мл с помощью пастеровской пипетки. Место прободения пипеткой стенки соответствующего органа предварительно прижигают шпателем. Кусочки тканей и органов вырезают из глубины стерильным скальпелем или ножницами также после предварительного обжигания поверхности. Каждый образец органов, ткани и т.п. помещают отдельно в стерильную посуду. Кусочки тканей и органов могут быть использованы для посева на месте изъятия методом отпечатков или после получения суспензий их в ИХН или СПБ путем растирания в ступке.

## ГЛАВА 4

### ПОСЕВ МАТЕРИАЛА И ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

21. Для выделения энтеробактерий в чистой культуре требуется соблюдение ряда условий: максимально ранний срок посева взятого материала; подбор соответствующих питательных сред для первичного посева; техника выполнения посева должна обеспечить рост изолированных колоний. Для культивирования посевов используют оптимальный по температурным условиям и сроку инкубации режим. Подлежащую изучению колонию снимают бактериологической петлей, прикасаясь к поверхности колонии в центре и не затрагивая соседние участки среды. Недопустимо охлаждать петлю прикосновением к поверхности питательной среды, визуальной свободной от микробного роста, на ней могут быть невидимые микроколонии.

22. Выбор питательных сред определяют, исходя из характера исследуемого материала (испражнения, кровь и т. д.) и представления о возможном содержании в нем тех или иных энтеробактерий и их ассоциаций. Питательные среды для первичного посева в соответствии с исследуемым материалом приведены в приложении 4 к настоящей Инструкции по применению.

При этом учитывают: данные сопроводительной документации, цель исследования, диагноз, эпидемическую ситуацию и др. Наряду с обоснованным выбором, важно качественное приготовление сред, строгое соблюдение указаний на этикетках или в рецептурных прописях. Пластинчатые среды подсушивают, на их поверхности не должна оставаться конденсационная жидкость. В набор сред должны быть включены среды как для выделения патогенных энтеробактерий, так и обеспечивающие возможность выделения условно-патогенных энтеробактерий (далее – УПЭ). Исключение возможно лишь при целенаправленных исследованиях в особых ситуациях.

23. Общим правилом является использование при посеве материала, содержащего смешанную микрофлору (испражнения, гной и т.д.) пластинчатых сред высоко селективного действия (Плоскирева, висмут-сульфит-агар (далее – ВСА), с добавлением антибиотиков и др.). Материал, обычно стерильный (кровь, спинномозговая жидкость и т.п.) сеют, на слабо селективные дифференциальные среды (агар с эозин-метиленовым синим (далее – ЭМС), Эндо) или слабощелочной питательный агар (далее – СПА).

24. С целью накопления сальмонелл, при исследовании испражнений или другого материала, содержащего обильную сопутствующую флору, могут быть использованы такие среды, как магниевая, селенитовая, Кауфмана или Мюллера, а при исследовании крови, спинномозговой жидкости и соскоба с розеол – желчный бульон, среда Рапорт или (для крови) дистиллированная и водопроводная вода. Для накопления иерсиний при исследовании всех материалов применяют буферную среду или ИХН, а для клебсиелл и энтеробактеров при исследовании крови – глюкозный бульон.

25. Прямой посев исследуемой пробы материала на пластинчатые селективно-дифференциальные среды и посев (при необходимости) в пробирку с жидкой средой обогащения проводят одновременно. При посеве на плотные среды, исследуемый материал наносят с помощью бактериологической петли, стеклянной палочки, ректального тампона или пипетки с последующим втиранием материала шпателем или петлей по всей поверхности среды. На высоко селективные среды посевной материал вносят в большем объеме (в 3-5 раз), чем на слабо селективные среды. В средах с антибиотиками, приготовленных «методом градиентной чашки» или с использованием бумажных полосок, посевной материал вносят в зону среды с антибиотиками и распределяют его по поверхности питательной среды.

Все посева (кроме целенаправленных посевов для выделения иерсиний) инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 18-20 часов (до 48 часов на ВСА). Инкубация засеянной селенитовой среды не должна превышать 18 часов. По окончании инкубации из сред обогащения для сальмонелл делают высевы на ВСА (при исследовании материала, содержащего сопутствующую микрофлору), а при исследовании крови, спинномозговой жидкости и соскоба с розеол – на среды Эндо, ЭМС,

СПА, делают высев также из сред обогащения для иерсиний и клебсиелл (энтеробактеров), соблюдая правила посева и инкубации как при прямом посеве.

При целенаправленном исследовании для выделения иерсиний лучше использовать среду Эндо, чем ЭМС. Посевы на этих средах инкубируют при 22<sup>0</sup>-25<sup>0</sup>С в течение 18-48 часов, просматривая чашки повторно через 48 часов инкубации. Засеянную буферную среду или ИХН сохраняют при температуре +4-6<sup>0</sup>С, первый высев на пластинчатую среду проводят через 24-86 часов инкубации, а при отрицательных результатах высевы повторяют на 5,7,11,14 дни инкубации.

26. Испражнения, если они доставлены без консерванта, суспендируют в ИХН в соотношении 1: 5 и тщательно перемешивают. При взятии материала ректальным тампоном его погружают в среду обогащения после посева на пластинчатые среды. При посеве в селенитовую среду обогащения испражнений, доставленных в лабораторию в фосфатно-буферном консерванте, (но не в глицериновом), возможно применение среды двойной концентрации, с соблюдением соотношения посевного материала и среды 1:1.

27. Кровь. Через 18-20 часов после посева и инкубации при 37<sup>0</sup>С делают высев на одну из слабо селективных пластинчатых сред или на СПА, при отрицательных результатах высевы повторяют на 3, 4, 6, 10 сутки.

28. Рвотные массы и промывные воды желудка, не подвергавшиеся центрифугированию, засевают с целью обогащения в соответствующие накопительные среды двойной концентрации, соблюдая соотношения засеваемого материала и среды 1:1, при посеве центрифугата применяют среды обогащения обычной концентрации.

29. Желчь (дуоденальное содержимое) засевают во флаконы с 50 мл СПБ в соотношении 1:10 и на пластинчатые среды Эндо, ЭМС. Оставшуюся желчь также помещают в термостат, делая из нее высев через 18-20 часов и на 3,5,7 сутки (в случае отрицательных результатов предыдущих высевов) на пластинчатые среды подобно высевам со сред обогащения.

30. Мочу после центрифугирования или без него сеют на пластинчатые среды Эндо, ЭМС, а также в среды обогащения, нецентрифугированную мочу – в среды двойной концентрации в соотношении 1:1.

31. Гной, пунктаты органов, экссудат, слизь из зева и носа, мокроту, отделяемое цервикального канала, грудное молоко, высевают в жидкие среды обогащения и на плотные питательные среды. Питательные среды для первичного посева в соответствии с исследуемым материалом приведены в приложении 4 к настоящей Инструкции по применению.

32. Спинномозговую жидкость засевают в жидкие питательные среды для обогащения и на пластинчатые среды. Питательные среды для первичного посева в соответствии с исследуемым материалом приведены в приложении 4 к настоящей Инструкции по применению.

33. Соскоб с розеол засевают в среду обогащения с последующим высевом на пластинчатые среды.

34. Операционный материал – содержимое червеобразного отростка, желчного пузыря исследуют как испражнения, желчь и мочу, а биоптаты органов или тканей засевают аналогично секционному материалу.

35. Секционный материал засевают, как указано в пункте 25 к настоящей Инструкции по применению, либо непосредственно на пластинчатые среды путем прикосновения (отпечатка) поверхности среза кусочков органов к агару, либо после получения взвеси засевают на плотные среды, если это необходимо, в среды обогащения. Кровь, мочу, желчь исследуют, как указано в пункте 25 к настоящей Инструкции по применению.

36. После культивирования посевов, просмотра чашек и отбора выросших колоний для дальнейшего исследования руководствуются их характеристиками. Характеристики колоний энтеробактерий различных видов приведены в приложении 5 к настоящей Инструкции по применению. Колонии, подозрительные на принадлежность к шигеллам или сальмонеллам, подлежат первоочередному отсеvu и изучению (не менее 3 колоний). При их отсутствии и показаниях к исследованию с целью выделения других представителей энтеробактерий снимают для изучения по 2-3 колонии с различными морфологическими характеристиками.

37. Для получения количественных показателей обсеменения исследуемого материала УПЭ, в случаях их выявления в отсутствие патогенных энтеробактерий и решения вопроса об этиологической значимости, могут быть проведены дозированные посеvy из проб материала на пластинчатые среды.

38. Для жидких субстратов разведения готовят объемным методом, разводя 0,1-1,0 мл исследуемой пробы в соотношении 1:10 (разведение  $10^{-1}$ ) в ИХН. Далее в двух пробирках, содержащих по 9,9 мл того же раствора, последовательно готовят разведения  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$ , перенося по 0,1 субстрата из предыдущего разведения. Всю работу проводят с соблюдением правил асептики, со сменой градуированных пипеток при переходе от предыдущего разведения к последующему. При исследовании испражнений предварительно следует приготовить навеску. Для количественного учета УПЭ на пластинчатые дифференциально-селективные среды высевают по 0,1 мл из разведений  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$  и тщательно растирают нанесенный на поверхность среды материал. На последующих этапах исследования, при подсчете выросших колоний, число колоний умножают на соответствующее разведение, из которого проводят высеv на чашку, и на 10, т.к. была высеяна доза 0,1 мл. Например: высеv из разведения  $10^{-3}$  привел к развитию на чашке 30 колоний однородных по своим характеристикам и отнесенных к роду *Citrobacter*. Для определения содержания их в 1 грамме исследованного материала 30 умножают на 1000 и на 10 ( $30 \times 1000 \times 10 = 300000 = 3 \times 10^5$ ). Таким образом, устанавливают, что в 1 грамме материала содержалось  $3 \times 10^5$  бактерий рода *Citrobacter*.

39. Отобранные для дальнейшего изучения колонии пересевают в одну из сред для первичной идентификации. При целенаправленном исследовании на энтеропатогенные эшерихии (далее – ЭПЭ) первичный отбор колоний (не менее 2-3 каждой разновидности) проводят с помощью реакции агглютинации на стекле с использованием поливалентной сыворотки ОКА. Остаток колоний, давших агглютинацию, высевают в среду для первичной идентификации и на скошенный агар для дальнейшего серологического изучения.



## ГЛАВА 5 ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

40. Идентификация энтеробактерий включает три этапа: первичную идентификацию, установление рода (дифференциацию родов) и идентификацию вида и внутривидовую дифференциацию.

Выполнение первого этапа предусматривает определение биохимических признаков изучаемой культуры с использованием сред для первичной идентификации (комбинированных сред), а при необходимости и тестов для дифференциации энтеробактерий от других грамотрицательных бактерий. На втором этапе применяют тесты минимального дифференцирующего ряда в наборе, необходимом для установления рода (дифференциация от сходных родов), а также вида у тех родов энтеробактерий, которые представлены единственным видом. Третий этап идентификации предполагает использование дополнительных биологических тестов для внутривидовой дифференциации – определение видов, внутривидовую дифференциацию, а при необходимости и наличии соответствующих диагностических сывороток, и серологическую внутривидовую дифференциацию.

41. При выделении шигелл, сальмонелл и ЭПЭ три этапа идентификации, а при исследовании с целью выделения других энтеробактерий – первые два этапа идентификации и частично третий этап (до вида) осуществляют все бактериологические лаборатории.

## ГЛАВА 6 ПЕРВИЧНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

42. Для первичной идентификации применяют комбинированные среды – Олькеницкого или Клиглера, на которых наряду с получением культуры для дальнейшего изучения, выявляют одновременно несколько признаков: способность образовывать сероводород и отношение к глюкозе, лактозе (а также сахарозе и мочеvine – на среде Олькеницкого). Посев материала из колонии на комбинированную среду проводят бактериологической петлей вначале по скошенной части штрихом и заканчивают уколом в толщу агарового столбика, не достигая дна пробирки. Посевы инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 18-20 часов, а при целенаправленных исследованиях на иерсинии – в течение того же времени, но при 22<sup>0</sup>-25<sup>0</sup>С.

43. О ферментации лактозы (и сахарозы) в среде Олькеницкого и ферментации лактозы в среде Клиглера судят по явлению желтой окраски в скошенной части агара, а ферментации глюкозы – по такому же окрашиванию в столбике. Газообразование устанавливают по появлению пузырьков, разрывам агара или его отслоению от стенок пробирки. Образование сероводорода устанавливают по почернению среды, обычно в средней части столбика, при значительной продукции H<sub>2</sub>S можно наблюдать почернение всей среды. В среде Олькеницкого при росте культуры, гидролизующей мочеvine, происходит подщелачивание, вследствие чего среда приобретает диффузный, яркий красно-малиновый цвет. В этом случае учет ферментации углеводов невозможен. При интенсивном образовании сероводорода, когда чернеет целиком вся среда, учет ферментации углеводов в

средах Клиглера и Олькеницкого затруднен. Следует помнить, что образование сероводорода может происходить лишь в кислой среде, которая создается за счет ферментации глюкозы, присущей всем энтеробактериям. Кроме того, при просмотре среды в проходящем свете видны на общем черном фоне участки пожелтевшего агара, что свидетельствует о ферментации углеводов.

44. По совокупности биохимических свойств, выявленных на комбинированной среде, делают предположительное заключение о возможной родовой принадлежности культуры. Далее выбирают дифференциально-диагностические тесты, необходимые для установления рода энтеробактерий, т.е. проводят дифференциацию родов. Первичная идентификация энтеробактерий по биохимическим реакциям в комбинированной среде и выбор тестов для установления родовой принадлежности приведены в приложении 6 к настоящей Инструкции по применению. Для эшерихий, эдвардсиелл, гафний, серраций это совпадает с определением вида.

45. В связи с тем, что набор определяемых с помощью комбинированных сред биохимических признаков не является достаточным для установления рода энтеробактерий, серологическую идентификацию исследуемой культуры на данном этапе не проводят, кроме постановки серологических проб с поливалентными сыворотками к сальмонеллам и шигеллам, ставят по выбору биохимические тесты для дальнейшей идентификации.

При возникновении сомнений в принадлежности изучаемой культуры к семейству Enterobacteriaceae следует использовать тесты, позволяющие дифференцировать энтеробактерии от других грамотрицательных микроорганизмов. Первичная идентификация энтеробактерий по биохимическим реакциям в комбинированной среде и выбор тестов для установления родовой принадлежности приведены в приложении 6 к настоящей Инструкции по применению. В числе этих тестов: изучение морфологических и тинкториальных свойств микроорганизмов путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму; OF-тест. Тип утилизации глюкозы – окисление (O), ферментация (F) или отсутствие активности (-); определение ферментов цитохромоксидазы, нитратредуктазы (редукция нитратов в нитриты). Дифференциация энтеробактерий от некоторых других грамотрицательных микроорганизмов приведена в приложении 7 к настоящей Инструкции по применению.

46. Микроскопию окрашенных по Граму мазков из сомнительных культур следует считать первоочередной, так как при этом могут быть выявлены особенности (например, кокковая форма), исключающие необходимость использования других тестов. Нечеткие результаты окраски по Граму у некоторых штаммов микроорганизмов родов (*Acinetobacter*, *Moraxella*, *Bacillus*) могут быть уточнены при использовании пробы с гидроксидом калия (далее – КОН). Для этого культуру суспендируют в капле 3% раствора КОН на предметном стекле. При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, жидкость в капле становится вязкой, нити тянутся за петлей на 0,5-2 см. Учет этой пробы более удобен на черном фоне.

47. Для постановки OF-теста изучаемую культуру высевают уколом в столбик среды Хью-Лейфсона (одновременно в две пробирки), в одну из пробирок затем вносят 0,5-1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы делают не-

большой петлей, не доводя ее до дна пробирки на 5-6 мм, инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 1-4 суток. Изменение цвета среды на желтый в обеих пробирках указывает на расщепление глюкозы путем ферментации (F), появление желтой окраски среды только в одной пробирке, не залитой вазелиновым маслом – об окислительном процессе (O), а сохранение исходного неизменного цвета в обеих пробирках – об отсутствии активности в отношении глюкозы (-).

48. Тест на цитохромоксидазу можно проводить по методу Эрлиха, для чего на поверхность роста 18-20 часовой агаровой культуры наносят каплю 1% водного раствора диметил-пара-фенилендиамина и добавляют каплю 1% спиртового раствора альфа-нафтола. При положительной реакции через 1-3 минуты появляется ярко-синее окрашивание. Тест можно воспроизвести также с помощью диска на цитохромоксидазу из бумажной индикаторной системы (далее - СИБ). Наличие цитохромоксидазы можно выявить по методу Ковача (известен как тест на оксидазу), являющемуся модификацией метода Эрлиха. По методу Ковача на культуру наносят несколько капель 1% водного раствора тетра-пара-фенилендиамина. При положительной реакции через 20-30 секунд появляется стойкое темно-красное окрашивание.

49. Тест на редукцию нитратов проводят путем посева одной петли суточной агаровой культуры в питательную среду, содержащую нитрат калия и инкубируют при 37<sup>0</sup>С до 4 суток с ежедневным учетом реакции. Для выявления восстановленных нитритов в пробирку с культуральной жидкостью вносят по 1 мл реактивов для определения редукции нитратов. При положительной реакции на нитраты появляется красное окрашивание, при отрицательной реакции на нитраты – цвет среды не меняется.

## ГЛАВА 7 ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РОДОВ

50. Небольшое число признаков, выявляемых у культур энтеробактерий на этапе первичной идентификации, не позволяет достоверно определить их родовую принадлежность. Обычно по сочетанию биохимических признаков на средах первичной идентификации (на комбинированных) можно заподозрить одновременно несколько (3-6) родов энтеробактерий. В связи с этим для установления родовой принадлежности изучаемой культуры следует провести дифференциацию родов, т.е. использовать соответствующие тесты из минимального дифференцирующего ряда. Дифференциация родовых групп энтеробактерий по биохимическим свойствам при использовании минимального дифференцирующего ряда приведена в приложении 8 к настоящей Инструкции по применению. Конкретный набор тестов определяют с учетом родов, подлежащих дифференциации. Первичная идентификация энтеробактерий по биохимическим реакциям в комбинированной среде и выбор тестов для установления родовой принадлежности приведена в приложении 6 к настоящей Инструкции по применению. При затруднении в дифференциации прибегают к определению дополнительных признаков у изучаемой культуры, используя данные о биохимических характеристиках родовых групп семейства Enterobacteriaceae. Расширенная характеристика

биохимических свойств родовых групп энтеробактерий приведена в приложении 9 к настоящей Инструкции по применению.

51. При определении подвижности посев культуры следует делать уколом петлей или иглой по центру столбика полужидкого СПА (0,3-0,4%), не доходя до дна пробирки.

52. Индолообразование определяют путем добавления реактивов Эрлиха или Ковача к культуре, выращенной в безуглеродной среде – пептонной воде (1-2%), бульоне Хоттингера, бульоне на триптическом переваре казеина. Вместо растворов реактивов Эрлиха или Ковача можно использовать пропитанную одним из реактивов полоску фильтровальной бумаги, которую помещают между стенкой и пробкой пробирки с культурой, выращенной в питательной среде или в полужидком агаре, используемом для определения подвижности. Все питательные среды, которые используют для определения индолообразования, следует предварительно проверять с тест-культурами, образующими индол.

53. Для выявления фенилаланиндезаминазы делают массивный посев штрихом по скошенной части соответствующей среды и после 18-24 часов инкубации на выросшую культуру наносят несколько капель 10% раствора хлорида железа ( $\text{FeCl}_3$ ).

54. При определении декарбоксилаз лизина и орнитина, дегидролазы аргинина наряду с посевами в среды с этими аминокислотами необходимо делать посев в контрольную пробирку, содержащую основу среды без аминокислоты. После посевов во все пробирки, включая контрольную пробирку, вносят стерильное вазелиновое масло слоем 4-5 мм.

55. Тесты со средами Симонса и ацетата натрия выявляют способность исследуемых культур использовать цитрат и ацетат (соответственно) как единственные источники углерода. Для посевов на эти среды берут минимальную инокулирующую дозу, снимая посевной материал без прикосновения петли к среде культивирования. Более целесообразно использовать для посева на эти среды суспензию бактериологической петли культуры в 1-1,5 мл ИХН, не допускается высев из бульона и других жидких питательных сред.

56. Для постановки тестов с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра используют среду Кларка в объеме 5-6 мл в пробирке, посев делают обычным способом. Первоначальный учет проводят через сутки, для чего по 1 мл культуральной жидкости переносят в две пробирки, в одну из которых добавляют 1-2 капли реактива метилового красного, и во вторую последовательно 0,5 мл 6% спиртового раствора альфанафтола и 0,2 мл 40% раствора КОН. Результаты основных биохимических реакций на комбинированных средах в минимальном дифференцирующем ряду приведены в приложении 10 к настоящей Инструкции по применению. Тест с метиловым красным учитывают сразу после добавления реактива, а тест Фогеса-Проскауэра – в течение 5-10 минут после встряхивания или после 1-2 часов пребывания в термостате. Пробирку с неиспользованной культурой в среде Кларка продолжают инкубировать в термостате до 2-4 суток, когда тесты с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра дают более четкие результаты. Для некоторых энтеробактерий, например, гафний, результаты реакций с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра различны при разных температурах культивирования ( $22^{\circ}$  или  $37^{\circ}\text{C}$ ), что может быть использовано в качестве дополнитель-

ного дифференцирующего теста. Посевы для воспроизведения других тестов не требуют специальных пояснений. Результаты основных биохимических реакций на комбинированных средах в минимальном дифференцирующем ряду приведены в приложении 10 к настоящей Инструкции по применению.

57. На этапе дифференциации родов можно использовать пробы с поливалентными сальмонеллезным и дизентерийным бактериофагами, диагностические жидкие или лечебные в таблетках. Таблетку лечебного фага перед постановкой пробы растворяют в 20 мл ИХН. Для постановки пробы с фагом используют 2-х или 18-ти часовую бульонную культуру, можно применять также взвесь суточной агаровой культуры в ИХН. Тонко оттянутой пастеровской пипеткой или петлей диаметром 4-5 мм наносят две капли испытуемой культуры на хорошо подсушенный СПА. На одну из капель после подсыхания наносят петлей или из очень тонкого капилляра пастеровской пипетки каплю фага, а на другую, служащую контролем, каплю стерильного бульона. Бактериофаг применяют в неразведенном виде. После постановки пробы чашки инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 18-20 часов. При положительной реакции на месте нанесения фага появляется четко очерченный лизис (++++), полусливной лизис (+++), большее или меньшее число отдельных негативных колоний (++,+). При отсутствии лизисов (отрицательная реакция) в местах нанесения фага, как и в контроле, наблюдают сплошной рост культуры.

58. На этапе дифференциации родов возможна постановка ориентировочных серологических проб с поливалентными агглютинирующими сыворотками к сальмонеллам и шигеллам. При этом используют соответственно поливалентную смесь к сальмонеллам групп ABCDE, при отрицательном результате пробу повторяют со смесью O-сывороток к сальмонеллам редких групп, и поливалентную смесь сывороток к *S. sonnei*, *S. flexneri* 1-5, *S. flexneri* 6. Ориентировочные пробы выполняют путем постановки реакции агглютинации на стекле с культурой, выросшей на среде первичной идентификации. В ходе исследования на ЭПЭ при отборе соответствующих колоний, давших агглютинацию с ОКА-сывороткой, делают посев не только на среду первичной идентификации, но и на скошенный СПА. Серологическое изучение эшерихий проводят с культурами, выращенными на скошенном СПА. Культуры, подозреваемые на принадлежность к ЭПЭ, исследуют повторно с поливалентной сывороткой ОКА и при положительном результате с ОКВ, ОКС, ОКD, ОКЕ или соответствующими ОК-иммуноглобулинами. При наличии положительной реакции культуру засевают в среды минимального дифференцирующего ряда для подтверждения принадлежности культуры к роду *Escherichia* (в первую очередь ацетатную, цитратную Кристенсена и для определения подвижности). Дифференциация родовых групп *Enterobacteriaceae* по биохимическим свойствам при использовании минимального дифференцирующего ряда приведена в приложении 8 к настоящей Инструкции по применению.

59. Помимо постановки тестов, необходимых для установления родовой принадлежности выделенной культуры энтеробактерий, со среды первичной идентификации делают также высев на скошенный СПА, используемый для дальнейшей биохимической и серологической идентификации.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ И ВНУТРИВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

60. Идентификация видов и внутривидовая дифференциация энтеробактерий составляют заключительный этап бактериологического исследования различных материалов. В большинстве случаев идентификация видов энтеробактерий предусматривает применение дополнительных к использованным на этапе определения рода биохимических тестов из минимального дифференцирующего ряда.

61. Для патогенных энтеробактерий, а также для некоторых условно-патогенных энтеробактерий, идентификация включает, кроме биохимической активности, и серологическую характеристику. Серологическая характеристика обеспечивает тонкую дифференциацию энтеробактерий вплоть до определения сероваров и подсероваров.

62. Другие возможности внутривидовой дифференциации, основывающиеся на особенностях взаимодействия с препаратами бактериофагов, на феномене колициногенности или определения биоваров, реализуются при наличии соответствующих эпидемических показаний.

## ГЛАВА 9

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ РОДА SHIGELLA

63. Род *Shigella* разделен на 4 подгруппы (A,B,C,D), соответствующие видам: *S.dysenteriae*, *S.flexneri*, *S.boydii*, *S.sonnei*. Классификация бактерий рода *Shigella* приведена в приложении 11 к настоящей Инструкции по применению.

64. Основные тесты для дифференциации видов, указанных в пункте 63 к настоящей Инструкции по применению, приведены в приложении 12 к настоящей Инструкции по применению, а для их внутривидовой дифференциации биохимические свойства сероваров *S.disenteriae*, *S.flexneri*, *S.boydii* приведены в приложениях 13-15 к настоящей Инструкции по применению.

65. Серологическую идентификацию шигелл проводят с помощью адсорбированных сывороток. Исследование начинают с основной поливалентной сыворотки, содержащей антитела к *S.flexneri* 1-6 и *S.sonnei*.

66. При положительном результате далее используют поливалентные сыворотки к *S.flexneri* (1-5), *S.sonnei* (I и II фаза) и сыворотку к *S.flexneri* 6. Учитывают и данные о биохимических свойствах выделенной культуры шигелл: например, шигеллы, образующие индол, не следует агглютинировать в сыворотках к *S.sonnei* и *S.flexneri* 6 (*S.newcastle*).

67. Установление антигенной формулы *S.flexneri* начинают с применения сероварспецифических сывороток (к антигенам I, II, III, IV, V, VI), а затем групповых (3,4;6;7,8). Классификация бактерий рода *Shigella* приведена в приложении 11 к настоящей Инструкции по применению.

При работе с культурами *S.flexneri* надо помнить, что иногда свежeweделенные штаммы слабо агглютинируются, особенно в сыворотках к групповым антигенам 3,4. В таких случаях следует для повышения агглютинабельности провести 1-2 пассажа 4-х часовой бульонной культуры с высевом на скошенный

СПА. Если культура агглютинирует в сыворотке к *S. sonnei*, ее серологическая идентификация считается завершённой. Метод определения биовара основан на вариабельной способности различных штаммов шигелл ферментировать некоторые углеводы или образовывать индол.

68. Метод определения биоваров *Shigella sonnei* основан на неодинаковой активности в отношении: рамнозы, ксилозы, мальтозы, что позволяет подразделить их на 7 стабильных биоваров. Схема определения биоваров *S. sonnei* приведена в приложении 16 к настоящей Инструкции по применению.

69. Бактерии, принадлежащие по культуральным и биохимическим свойствам к шигеллам, но на агглютинирующиеся в основной поливалентной сыворотке, испытывают с поливалентными сыворотками к другим видам шигелл: к *S. dysenteriae* (если они не сбрасывают маннит) или к *S. boydii* (в случае маннитферментирующих штаммов). При положительной реакции в одной из применённых сывороток культуру испытывают с сероварспецифическими сыворотками, входящими в данную поливалентную смесь.

70. Некоторые шигеллы (*S. dysenteriae*, *S. flexneri* 6, *S. boydii*) могут иметь хорошо развитые К-антигены, вследствие чего живые культуры не агглютинируются в соответствующих сыворотках. Взвеси таких культур в ИХН следует прогреть на водяной бане при 100<sup>0</sup>С в течение 1 часа. При этом обязателен контроль культуры до кипячения на спонтанную агглютинацию в капле ИХН, для ее исключения. В случаях каких-либо затруднений при серологической идентификации шигелл необходимо провести рассев штамма в чашке с дифференциальной средой ЭМС или Эндо, с целью проверки чистоты культуры и повторно провести биохимическую идентификацию.

## ГЛАВА 10 ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ РОДА SALMONELLA

71. Дифференциацию микроорганизмов принадлежащих к роду *Salmonella* проводят с использованием биохимических тестов. Дифференциация подродов *Salmonella* по биохимическим свойствам приведена в приложении 17 к настоящей Инструкции по применению. Дальнейшую идентификацию представителей рода *Salmonella* проводят согласно антигенно-диагностической схеме Кауфмана-Уайта с применением агглютинирующих сывороток. Ориентировочная проба в реакции агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой к сальмонеллам О-групп ABCDE (к антигенам 2,4,7,8,9,3,10), а при ее отрицательном результате и с поливалентной сывороткой к сальмонеллам редких О-групп (к антигенам 11,13,14,16,17,23 и др.) возможна еще на этапе определения рода. После подтверждения биохимическими тестами принадлежности выделенной культуры к роду *Salmonella* реакции с поливалентными сыворотками повторяют и переходят к определению О-группы сальмонелл по схеме Кауфмана-Уайта с помощью отдельных О-сывороток, входящих в соответствующую поливалентную. Сокращенная схема Кауфмана-Уайта приведена в приложении 18 к настоящей Инструкции по применению.

72. Подрод I включает большинство известных сероваров сальмонелл, к подроду II и IV относят редко встречающиеся серовары. К подроду III отнесены

бактерии, ранее известные как бактерии Arizona, принадлежащие к разным сероварам. Сальмонеллы первого подрода варьируют по некоторым биохимическим свойствам.

73. После установления принадлежности культуры к O-группе определяют полную структуру ее O-антигенов, а затем испытывают с монорецепторными H-сыворотками также в реакции агглютинации на стекле. После выявления H-антигена первой фазы определяют антигенные компоненты второй фазы и устанавливают полную антигенную формулу (серовар) выделенной культуры. Для определения антигенной формулы некоторых сероваров из групп C<sub>1</sub> и D<sub>1</sub> культуру испытывают с Vi-сывороткой для выявления Vi-антигена (*S.typhi*, *S.dublin* и *S.paratyphi C*).

74. Для реакции агглютинации с O-сывороткой следует брать культуру с верхней части скошенного агара, для H-сывороток – конденсат или из нижнего участка роста (наиболее подвижные особи). При отсутствии четкой реакции агглютинации с O-сывороткой проводят пассаж культуры (4-5 раз) на 10% желчном бульоне и скошенном СПА с последующим рассевом на чашки с СПА и отбором отдельных колоний. При серологической идентификации возможны трудности в определении H-антигена или одной из его фаз, что может быть связано с угнетением или утратой H-антигена (утрата подвижности), либо с преобладанием в популяции особей с преимущественным содержанием какой-либо одной фазы. Для некоторых сальмонелл характерно отсутствие H-антигена (*S.gallinarum*, *S.pullogum*) или отсутствие первой фазы H-антигена (*S.choleraesuis*).

75. Для выявления искомой фазы H-антигена используют феномен роения по Гарду, для чего применяют мягкий (0,8-1%) СПА в чашках. В центре чашки с СПА наносят 1-2 капли агглютинирующей сыворотки, соответствующей выявленной фазе, после подсыхания сыворотки на тот же участок сеют «бляшкой» (диаметр 3-4 мм) 18-20 часовую агаровую культуру. Распространение бактерий, богатых H-антигеном этой фазы, будет угнетено, в то время как особи бактерий, содержащие преимущественно другую (не выявленную) фазу, будут распространяться на поверхности мягкого агара, за пределы «бляшки» (макроколонии). С периферии такой макроколонии берут бактериологической петлей материал и испытывают в реакции агглютинации на стекле с различными H-сыворотками.

76. Для определения не выявленной фазы H-антигена, можно использовать: U-образную трубочку, заполненную полужидким (0,2-0,4%) СПБ смешанным с поливалентной H-сывороткой. Для выявления наиболее подвижных особей в слабо-подвижной или неподвижной культуре используют также U-образную трубочку с полужидким агаром, но без добавления сыворотки. Для отбора подвижных особей исследуют культуру из противоположного от посева колена трубочки.

В некоторых случаях для дифференциации биоваров *Salmonella* с одинаковой антигенной формулой необходимо определение дополнительных биохимических свойств. Дифференциация *Salmonella* с однотипной антигенной структурой по биохимическим свойствам приведена в приложении 19 к настоящей Инструкции по применению.



ВНУТРИВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ РОДА *ESCHERICHIA*

77. Эшерихии - палочковидные бактерии, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia*, который состоит из пяти видов *E.coli*, *E.blattae*, *E.hermanii*, *E.vulneris*, *E.fergusonii*. Внутривидовая идентификация рода *Escherichia* приведена в приложении 20 к настоящей Инструкции по применению. Особенность рода состоит в том, что непатогенные разновидности эшерихий являются постоянными обитателями кишечника человека, животных, птиц и широко распространены в природе.

78. Патогенные эшерихии, входящие в этот же род, не отличаются от непатогенных по морфологическим и культуральным свойствам, поэтому при исследовании на наличие патогенных эшерихий (включая ЭПЭ) изучению подлежат разнообразные по морфологическим характеристикам колонии эшерихий, выросшие на пластинчатых средах. Основные биохимические свойства вида *Escherichia coli* приведены в приложении 21 к настоящей Инструкции по применению.

При исследовании на эшерихии ход анализа различен в зависимости от поставленной задачи (поиск ЭПЭ или возбудителей парентеральных эшерихиозов).

79. При выделении и идентификации (определение сероваров) ЭПЭ, поиск и первичный отбор колоний, выросших на чашках первичного посева, проводят серологическим методом в реакции агглютинации на стекле с использованием поливалентной сыворотки ОКА. Состав поливалентных ОК-сывороток для серологической идентификации энтеропатогенных эшерихий приведен в приложении 22 к настоящей Инструкции по применению. Оставшуюся часть колоний, давшую положительную реакцию агглютинации с сывороткой ОКА, отсеивают на скошенный агар и на одну из комбинированных сред для первичной идентификации. Культуры, «подозрительные» на принадлежность к роду *Escherichia* (по данным комбинированной среды), на следующие сутки повторно проверяют в реакции агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой ОКА и при положительном результате испытывают с поливалентными сыворотками (ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ) или ОК-иммуноглобулинами. При наличии положительной реакции культуру засевают со скошенного агара в питательные среды для воспроизведения тестов минимального дифференцирующего ряда, необходимых (с учетом результатов, полученных на комбинированной среде) для подтверждения принадлежности культуры к роду *Escherichia*. Дифференциация родовых групп *Enterobacteriaceae* по биохимическим свойствам при использовании минимального дифференцирующего ряда приведена в приложении 8 к настоящей Инструкции по применению. Тест для определения подвижности ставят не обычным способом уколов в столбик полужидкого агара, а в пробирках по Крейджи (до стерилизации в бактериологическую пробирку с полужидким агаром помещают трубочку – отрезок стеклянного дрота длиной 3-4 см). Посев делают в верхний конец трубочки, выступающий над поверхностью агара в пробирке. Это дает возможность одновременно «накопить» материал для исследования Н-антигенов.

80. При получении на следующий день результатов (учет дифференциальных биохимических тестов), подтверждающих принадлежность культуры в роду *Escherichia*, проводят дальнейшую серологическую идентификацию для опреде-

ления сероваров ЭПЭ (О-, К-, Н-антигенов). Для исследования О- и К-антигенов используют суточную культуру на скошенном СПА, для исследования Н-антигена с поверхности агара из пробирки Крейджи культуру засевают на скошенный глицериновый агар. Культуры эшерихий, давшие реакцию агглютинации с одной из поливалентных ОК-сывороток (ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ) или иммуноглобулинами, испытывают в реакции агглютинации на стекле с отдельными групповыми ОК-сыворотками, входящими в данную поливалентную смесь, или ОК-иммуноглобулинами. Состав поливалентных ОК-сывороток для серологической идентификации энтеропатогенных эшерихий приведены в приложении 22 к настоящей Инструкции по применению.

81. Полученный ориентировочный положительный результат с отдельной ОК-сывороткой необходимо подтвердить в реакции агглютинации на стекле с ОК-иммуноглобулином (живые бактерии) и адсорбированными групповыми и факторными О-сыворотками (бактерии, прогретые при 100<sup>0</sup>С в течение 30 минут). Препараты для окончательной серологической идентификации энтеропатогенных эшерихий в реакции агглютинации на стекле приведены в приложении 23 к настоящей Инструкции по применению.

82. Ответ об обнаружении определенной ОК-группы ЭПЭ выдается при наличии реакции агглютинации живой культуры с соответствующими ОК-сывороткой и гретой культуры с адсорбированной О-сывороткой. Исключение составляет *E.coli* O151, когда положительный ответ выдают по результату агглютинации живой культуры на стекле с адсорбированной сывороткой O151:К. ОК-иммуноглобулины, как более специфичные препараты, следует использовать взамен отдельных ОК-сывороток. При наличии необходимого ассортимента иммуноглобулинов серологическую идентификацию ЭПЭ проводят с этими препаратами после получения положительного результата в какой-либо из поливалентных сывороток (или поливалентных иммуноглобулинов), исключая этап «ориентировочного, положительного результата» с ОК-сывороткой.

83. При отсутствии ОК-иммуноглобулинов и адсорбированных О-сывороток для реакции агглютинации на стекле, определение ОК-группы эшерихий проводят обычным способом при помощи ОК-сывороток в пробирочной реакции агглютинаций с живой и прогретой (при 100<sup>0</sup>С – 1 час) культурами. Для постановки пробирочной реакции агглютинации в объеме 1 мл делают два ряда возрастающих двукратных разведений сывороток в стерильном ИХН, начиная с разведения 1:50 до титра, указанного на этикетке, не принимая во внимание титра К-антител. Во все пробирки первого ряда вносят по 1 капле взвеси живых бактерий в ИХН, а второго ряда – по 2 капли той же взвеси бактерий, предварительно прогретой и охлажденной.

84. Контролем антигенов являются взвеси живых и прогретых бактерий в пробирках с ИХН в том же объеме, что и в разведениях сыворотки. Учет результатов проводят через 18-20 часов инкубации при 37<sup>0</sup>С невооруженным глазом (живая культура) и в агглютиноскопе (прогретая культура). Для живой культуры характерно образование крупнохлопчатого К-агглютината, для прогретой – мелкозернистого О-агглютината. Результат оценивают как положительный при одновременном наличии К-агглютината до титра или половины титра К-антител, указанного на этикетке, а также О-агглютината до титра или половины титра О-

антител, указанного на этикетке, либо О-агглютината в обеих рядах пробирок до титра или половины титра О-антител. Последнее указывает на отсутствие К-антигена (*E.coli* O151:K) или на его потерю у штамма, принадлежащего к определенной серогруппе.

85. После установления ОК-серогруппы у подвижных штаммов *E.coli* определяют серовар по Н-антигену. Штаммы, предварительно пассированные на полужидком агаре в пробирке Крейджи могут быть испытаны двумя способами: в реакции агглютинации на стекле и методом иммунобилизации в полужидком агаре в пробирках. В обоих случаях используют диагностические Н-сыворотки, которые выпускают для метода иммобилизации. Вначале применяют поливалентные, при положительном результате – моновалентные Н-сыворотки, входящие в смесь. В реакции агглютинации на стекле используют взвесь культуры, выросшей на глицериновом агаре после пассажа в пробирке Крейджи. Для получения взвеси в пробирку наливают ИХН до верхнего края скошенного глицеринового агара, осторожно смывают культуру бактерий, вращая пробирку между ладонями. Каплю взвеси бактерий пипеткой вносят в каплю сыворотки на стекле и смешивают при покачивании. Образование агглютината указывает на положительный результат.

86. Для постановки реакции иммобилизации среду готовят заранее. Сыворотку смешивают с предварительно растопленным и охлажденным до 45<sup>0</sup>-50<sup>0</sup>С полужидким (0,3%) СПА, в соответствии с наставлением по применению препаратов. Не допуская застывания, среду разливают по 2,5 мл в стерильные пробирки. Для контроля стерильности пробирки со средой помещают в термостат на 48 часов при 37<sup>0</sup>С. Стерильная среда может быть использована для работы, при сохранении ее в холодильнике, в течение месяца. Культуру подвижных штаммов, с верхнего слоя полужидкого агара в пробирке Крейджи, засевают уколом в пробирки с приготовленной средой, инкубируют (20-37<sup>0</sup>С) в течение 18-20 часов. При соответствии Н-антигена и Н-сыворотки бактерии растут вдоль линии укола (положительный результат). При несоответствии Н-антигена и Н-сыворотки наблюдается рост в виде диффузного помутнения среды в пробирке (отрицательный результат). В случаях определения Н- антигенов у слабоподвижных штаммов проводят многократное пассирование на полужидком агаре в пробирках Крейджи, после чего определяют Н-антиген. Антигенно-диагностическая схема известных разновидностей энтеропатогенных эшерихий представлена в приложении 24 к настоящей Инструкции по применению.

87. Во всех случаях, включая поиск возбудителей парентеральных эшерихиозов, исследование проводят обычным бактериологическим методом, начиная с определения вида *E.coli* по биохимическим признакам с последующим серологическим типированием.

88. Среди культур, выделяемых при этом, могут быть штаммы с Н-антигеном типа А, который не разрушается при кипячении. Поэтому в случае О-инагглютинабельности бактерий после кипячения их следует автоклавировать при 120<sup>0</sup>С в течение 2,5 часов, после чего повторно испытывать в реакции агглютинации с О-сыворотками. Серологическое типирование эшерихий, не относящихся к ЭПЭ, проводят по О- и Н-антигенам при наличии диагностических пре-

паратов. Антигенно-диагностическая схема возбудителей парентеральных эшерихиозов приведена в приложении 25 к настоящей Инструкции по применению.

89. Штаммы, принадлежащие по биохимическим свойствам к виду *E.coli*, испытывают в реакции агглютинации на стекле. Дифференциация родовых групп *Enterobacteriaceae* по биохимическим свойствам при использовании минимального дифференцирующего ряда приведена в приложении 8 к настоящей Инструкции по применению. Для этого суточный рост культуры на скошенном СПА смывают 2 мл ИХН. Полученную густую взвесь переносят в пробирки и прогревают на водяной бане при 100<sup>0</sup>С в течение 30 минут. Одну каплю гретого диагностикума соединяют с каплей сыворотки на предметном стекле путем многократного покачивания, после чего учитывают результат при помощи лупы или вогнутого зеркала. Реакция может быть замедленной, в связи с чем отрицательный результат наблюдают 3-5 минут. В положительном случае образуется мелкозернистый О-агглютинат.

90. После установления О-антигена у штамма определяют Н-антиген в пробирочной реакции агглютинации, для чего можно использовать Н-сыворотки, выпускаемые для реакции иммобилизации. Сыворотку с этой целью используют в том же или в 2 раза большем разведении, чем для реакции иммобилизации. Для приготовления Н-диагностикума исследуемый штамм пассируют в полужидком 0,8% СПА в пробирках Крейджи, трехкратно. После пассирования штамм засевают в пробирку с бульоном, выращивают до следующего дня в термостате при 25-30<sup>0</sup>С, при отсутствии этих условий можно выращивать при 37<sup>0</sup>С. В бульонную культуру добавляют 0,5% формалина и оставляют при комнатной температуре до следующего дня. Реакцию агглютинации ставят в узкой или лучше конусообразной пробирке, содержащей 0,5 мл разведенной сыворотки с добавлением равного объема приготовленного формализированного диагностикума. Инкубируют 2 часа при 37<sup>0</sup>С и 30 минут при комнатной температуре. Результат учитывают невооруженным глазом, избегая встряхивания пробирки. В случае положительных результатов образуется рыхлый придонный агглютинат, легко разрушающийся при встряхивании. При наличии Н-сывороток для реакции агглютинации Н-антиген определяют в реакции агглютинации на стекле без предварительного многократного пассирования штамма через полужидкий агар. Серовары *Escherichia coli*, наиболее часто вызывающие поражения у человека приведены в приложении 26 к настоящей Инструкции по применению.

## ГЛАВА 12

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ РОДОВ *CITROBACTER*, *KLEBSIELLA*, *ENTEROBACTER*, *HAFNIA*, *SERRATIA*, *PROTEUS*, *EDWARDSIELLA*, *YERSINIA*, *ERWINIA*

91. Внутривидовая дифференциация рода *Citrobacter* приведена в приложении 27 к настоящей Инструкции по применению.

92. Род *Klebsiella*. Характерной особенностью представителей рода *Klebsiella* является их неподвижность, способность образовывать капсулы. Род представлен тремя видами, дифференциацию которых осуществляют с помощью

тестов. Внутривидовая дифференциация рода *Klebsiella* приведена в приложении 28 к настоящей Инструкции по применению.

93. Род *Enterobacter* объединяют подвижные, иногда образующие капсулы энтеробактерии, представленные двумя видами: *E. cloacae* и *E. aerogenes*. Дифференциацию видов проводят с помощью биохимических тестов. Внутривидовая дифференциация рода *Enterobacter* приведена в приложении 29 к настоящей Инструкции по применению.

94. Род *Hafnia*. Характерным свойством гафний является изменение ферментативной активности при различной температуре культивирования (реакции с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра, газообразование в среде Гисса с глюкозой, утилизация цитрата в среде Симонса).

95. Род *Hafnia* представлен одним видом *Hafnia alvei*. Основные биохимические свойства *Hafnia alvei* приведены в приложении 30 к настоящей Инструкции по применению.

96. Род *Serratia*. Представители рода подвижны, иногда образуют капсулу; обращает на себя внимание способность некоторых штаммов образовывать пигмент фуксиново-красного или розового цвета. Род представлен одним видом *Serratia marcescens*, объединяющим ряд биоваров, расцениваемых в некоторых классификациях как самостоятельные виды (*S. liquefaciens*, *S. rubiuacea*). Дифференциация биоваров вида *S. Marcescens* приведена в приложении 31 к настоящей Инструкции по применению.

97. Род *Proteus*. В состав рода входит 4 вида, из которых двум видам *P. vulgaris* и *P. mirabilis* свойственна способность к роению (вуалеобразный рост на плотных средах). Идентификацию видов осуществляют с использованием биохимических тестов. Внутривидовая дифференциация рода *Proteus* приведена в приложении 32 к настоящей Инструкции по применению. Бактерии рода *Providencia* – длительное время относили к роду *Proteus*, но выявленные биохимические отличия, а так же исследования ДНК послужили основанием для выделения бактерий в отдельный род. Все виды выделяют из фекалий при диарее.

98. Род *Edwardsiella* представлен одним видом *Edwardsiella tarda*. Основные биохимические свойства *Edwardsiella tarda* приведены в приложении 33 к настоящей Инструкции по применению.

99. Род *Yersinia* включает одиннадцать видов: *Y. aldovae*, *Y. bercacovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*. *Y. pestis* подлежит изучению в специальной сети лабораторий. *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* патогенны для различных животных и для человека. Характерной особенностью *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* является более низкий оптимум температуры культивирования (22-25<sup>0</sup> С) и рост на пластинчатых средах в виде колоний-росинок, нередко с выраженным полиморфизмом, усугубляющимся при 37<sup>0</sup>С и менее выраженным при 22-25<sup>0</sup>С. По совокупности биохимических тестов, может быть проведена дифференциация видов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Внутривидовая дифференциация рода *Yersinia* приведена в приложении 34 к настоящей Инструкции по применению.

Определение серологических характеристик иерсиний в практических лабораториях не проводят в связи с отсутствием производственного выпуска диагностических сывороток.

Дополнительным тестом для идентификации *Y.pseudotuberculosis* служит достаточно специфичный бактериофаг (L-412). Большинство свежeweделенных штаммов *Y.pseudotuberculosis* хорошо лизируется этим бактериофагом, методика постановки пробы, с использованием цельного и разведённого фага проводится в соответствии с инструкцией по применению бактериофагов.

100. Род *Erwinia* по совокупности биохимических и других биологических свойств делят на три группы, объединяющие 13 видов. Оптимум роста 27-30°C. Из клинических материалов от человека и животных выделяют *Erwinia herbicola*. Оптимальной температурой для *E. herbicola* является 25-27°C. Некоторые представители обладают способностью образовывать жёлтый пигмент. Биохимические свойства *Erwinia herbicola* приведены в приложении 35 к настоящей Инструкции по применению.

### ГЛАВА 13

#### УСКОРЕННАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ. СИСТЕМЫ ИНДИКАТОРНЫЕ БУМАЖНЫЕ

101. Методы ускоренной идентификации и выявления антигенов энтеробактерий направлены либо на ускорение этапов обычного бактериологического анализа, либо на индикацию бактерий без выделения чистой культуры возбудителя.

102. Системы индикаторные бумажные (далее-СИБ) состоят из индикаторных бумажек, представляющих собой пропитанные необходимыми для дифференциации субстратами индикаторные диски или полоски хроматографической бумаги стабилизированные полимерным покрытием. СИБ выпускают в виде наборов разного назначения: набор № 1 (включает 13 наименований) предназначен для идентификации вибрионов; № 2А – малый набор, включающий 9 наименований, для межродовой дифференциации энтеробактерий. Он позволяет определить ферментацию лактозы, образование сероводорода и индола, утилизацию цитрата и малоната, гидролиз мочевины, дезаминирование фенилаланина, декарбоксилирование лизина и иначе β-галактозидазы. Набор № 2Б – расширенный, включающий 25 наименований, предназначен для дальнейшей дифференциации энтеробактерий. В него включены, помимо субстратов, содержащихся в наборе № 2А, орнитин, желатин, реактив для определения цитохромоксидазы и широкий набор углеводов. Набор № 3 предназначен для ускоренного определения обсеменённости воды *E. coli* и состоит из двух компонентов, обеспечивающих определение ферментации глюкозы и цитохромоксидазы.

Работа с СИБ требует наличия чистой 18-24 часовой агаровой культуры.

103. Для определения цитохромоксидазы суточную агаровую культуру растирают петлёй на соответствующей индикаторной бумажке, помещённой в чашку Петри. Цитохромоксидазоположительные культуры вызывают синее окрашивание через 30-60 секунд. Цитохромоксидазоотрицательные – не изменяют окраски.

104. Образование индола определяют в пробирках с 0,2-0,3 мл ИХН, рН 7,2-7,4, куда вносят полную петлю агаровой культуры и затем стерильным пин-

цветом опускают в пробирку сложенную вдвое «индольную» бумажку, так, чтобы короткий конец, имеющий желтоватую окраску, находился над поверхностью суспензии. Пробирки помещают в термостат на 2 часа, положительный результат – красно-малиновое окрашивание – зачастую проявляется уже через 30-40 минут.

105. Фенилаланиндезаминазу определяют также в микробной взвеси. В пробирку погружают диск с фенилаланином, выдерживают 1 час при 37°C и затем погружают в суспензию другой диск – с хлоридом железа. При положительном результате 10-15 секунд появляется зелёное окрашивание.

106. Наличие  $\beta$ -галактозидазы определяют, помещая в суспензию на 4-6 часов при 37°C соответствующий диск. Предварительный учёт возможен через 1 час. В случае положительной реакции диск желтеет.

107. Определение желатиназы проводят также в микробной взвеси, помещая в неё диск засвеченной и проявленной фотоплёнки, с последующей инкубацией при 37°C в течение 18-24 часов. Предварительный учёт возможен через 4-5 часов. При положительной реакции фотоплёнка просветляется, а на дно пробирки выпадает чёрный осадок.

108. Образование сероводорода определяют в чашках Петри на СПА или пробирках с полужидким агаром (0,4-0,6%). На поверхности агара в чашке делают посеы в виде площадок, примерно 0,5см-2см. В полужидкий агар культуру засевают уколом. Индикаторные бумажки помещают на засеянные площадки или на поверхность полужидкого агара в пробирку. Посевы инкубируют 18-24 часа при 37°C. Предварительный учёт возможен через 5 часов. При положительной реакции диски чернеют. В пробирках можно учитывать также и подвижность бактерий.

109. При определении отношения к аминокислотам, утилизации цитрата и малоната суточную агаровую культуру суспендируют в 0,2-0,6 мл забуференного раствора ИХН с рН-5,4-5,6. В суспензию помещают (стерильным пинцетом) соответствующие индикаторные диски и выдерживают при 37°C 18-24 часа. Пробирки с «аминокислотными» дисками до инкубирования заливают стерильным вазелиновым маслом (0,1-0,2 мл). При положительном результате в тестах с аминокислотами появляется синее или интенсивно зелёное окрашивание. В тестах с цитратом окрашивание малиново-красное, при этом возможен предварительный учёт через 5 часов.

110. Ферментацию углеводов определяют на СПА в чашках Петри или в пробирках, содержащих 0,2-0,3 мл ИХН или 1% пептонной воды. «Углеводные» диски помещают на засеянные площадки агаровой поверхности или в пробирки с микробной известью. Для определения газообразования на диск с глюкозой в чашке (0,6-0,8%) агара, а в пробирку с «глюкозным» диском помещают маленький кусочек стерильной ваты. Чашки и пробирки выдерживают в термостате при 37°C 5 часов. При положительном результате диски на агаровых культурах изменяют первоначальный красный цвет на жёлтый, в пробирках среда приобретает жёлтую окраску. В чашках результаты следует учитывать точно через 5 часов (позднее возможна редукция); в пробирках учёт результатов возможен и через 18-20 часов.

111. СИБ могут давать нечёткие результаты при работе со смешанными культурами, недостаточной концентрации микробных клеток в суспензиях, нарушении режима pH, и некоторых других факторах.

## ГЛАВА 14 МЕТОД ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

112. Метод применяют для обнаружения энтеробактерий в испражнениях, рвотных массах и другом материале от больных или из объектов окружающей среды в качестве экспресс-метода индикации.

113. Для учёта реакции используют люминесцентный микроскоп. Препараты для исследования готовят путём непосредственного нанесения материала на предметное стекло, в случае предположения о массивном обсеменении или с предварительным подрачиванием на питательных средах. В первом случае при исследовании жидкого материала делают тонкий мазок, при оформленном стуле или исследовании пищевых продуктов готовят 25% суспензию в ИХН. Для мазка используют верхнюю часть суспензии после её отстаивания в течение 20 минут или центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5-10 минут. При подрачивании в соответствующих средах обогащения их выдерживают при 37°C в течение 18-20 часов, на плотных дифференциально-селективных средах – 4 часа, после чего готовят мазки или отпечатки. Наиболее достоверные результаты получают при сочетании исследований прямых мазков и мазков после подрачивания. Иммунофлуоресценцию можно использовать при обычном ходе бактериологического анализа, сделав мазки из подозрительных колоний, выросших на плотной среде (Эндо, ЭМС-агар, среда Плоскирева, ВСА).

Для выделения энтеробактерий используют прямой и непрямой люминесцентно-серологический методы.

114. Прямой люминесцентно-серологический метод – мазки исследуемого материала подсушивают на воздухе и фиксируют 98<sup>0</sup> этиловым спиртом, можно смесью Никифорова в течение 15 минут или путём трёхкратного проведения через пламя горелки. Фиксированные препараты немедленно помещают во влажную камеру, наносят на них пастеровской пипеткой каплю люминесцирующей сыворотки в рабочем разведении на срок, указанный в наставлении по применению люминесцирующей сыворотки. После экспозиции мазки тщательно промывают ИХН или 0,15% раствором NaCl в течение 10 минут, дважды меняя раствор в стаканчике, или под текущей струёй, ополаскивают дистиллированной водой и подсушивают на воздухе. В случае необходимости фиксированные мазки можно хранить несколько дней в минусовом отсеке холодильника.

При необходимости корректирования рабочего разведения заведомо известный штамм подвергают окрашиванию люминесцирующей сывороткой, взятой в нескольких разведениях выше и ниже указанного на этикетке. Максимальное разведение, которое обеспечивает яркое специфическое свечение микробов в данном микроскопе, оценивают как «красящий титр».

Мазки исследуют в тёмной комнате. При использовании иммерсионной системы применяют специальное не люминесцирующее масло. Для получения достоверных результатов необходимо просматривать не менее 20-25 полей зрения.



Бактерии, окрашенные люминесцирующей сывороткой, имеют яркое зеленоватое свечение периферии клетки, по морфологии соответствующей энтеробактериям. Такое свечение называют специфическим, в отличие от неспецифического, характеризующегося равномерным свечением всего тела клетки.

115. Для оценки интенсивности свечения используют систему 4-х плюсов; ++++ очень яркая флуоресценция на периферии клеток, чётко контрастирующая с тёмным телом бактерий; +++ яркая флуоресценция периферии клетки; ++ или + слабое свечение периферии клетки, но контрастирующее с телом клетки.

Положительными результатами считают реакции на ++++ и +++ при наличии 2-5 специфически светящихся клеток в каждом поле зрения. В отношении антигенно обособленных энтеробактерий, например *S.sonnei*, для положительного ответа достаточно обнаружить в препарате идентичные ярко светящиеся палочковидные микробы.

Прямая микроскопия мазка из нативного материала от больных при высокой концентрации возбудителя 500 тысяч – 1 млн клеток в 1г позволяет дать положительный ответ через 45-60 минут. При использовании метода накопления и при незначительной концентрации возбудителя (тысячи – десятки клеток) результаты могут быть получены в период от 5 до 20 часов.

116. Непрямой люминесцентно-серологический метод – на препарат, содержащий антиген, наносят капли диагностической намеченной сыворотки и оставляют при комнатной температуре на 10-20 минут во влажной камере, затем промывают 0,15м раствором NaCl (рН 7,2-7,4) дважды по 10 минут для удаления не связавшейся сыворотки. Мазки подсушивают на воздухе и на 10-20 минут наносят капли люминесцирующей антивидовой сыворотки против глобулинов того вида животного, от которого получена применяемая иммунная сыворотка. Мазки промывают и просматривают как при прямом методе. Для непрямого метода обязателен контроль: изучаемый антиген, обработанный люминесцирующей сывороткой.

## ГЛАВА 15 ФОРМУЛИРОВКА ОТВЕТОВ, СРОКИ ВЫДАЧИ

117. В ответе о выделении патогенных энтеробактерий название микроорганизмов следует давать в латинской транскрипции, указывая его род, вид, серологическую характеристику; в случаях определения эпидмаркеров эти данные указывают после названных.

Наименование сероваров эшерихий приводят по их антигенным формулам с указанием О-, К-, Н-антигенов (для энтеропатогенных разновидностей); О- Н-антигенов – для возбудителей парентеральных эшерихиозов.

Например: «Выделены *S.flexneri* (*Shigella flexneri*) 4a (биовар 7)»  
 «Выделены *S.typhi* (*Salmonella typhi*)»  
 «Выделены *E.coli* (*Escherichia coli*) 055:K59:H2» или  
 «Выделены *E.coli* (*Escherichia coli*) 01:H4»

При выделении УПЭ, в отсутствие патогенных энтеробактерий, вначале следует указать: «Патогенные энтеробактерии не выделены, выделены ...».

В случае проведения количественных определений УПЭ после их названия указывают: «... $10^7$  колониеобразующих единиц (далее - КОЕ/г (мл)).»

Если дозированные посе́вы не применяли (количественные определения не проводили), однако в прямом посе́ве на пластинчатых средах очевидно преобладание однородных колоний названного вида (при исследованиях материалов, имеющих собственную микрофлору) следует указать: «...обильный рост ... или «...абсолютное преобладание ...».

Отрицательный ответ при бактериологических исследованиях на выделение патогенных энтеробактерий может быть выдан в следующие сроки:

при исследовании крови – на 10-й день исследования, после четырех высевов на пластинчатые среды;

при исследовании желчи (дуоденального содержимого) – на 8-й день исследования, после 4-х высевов на пластинчатые среды; при исследовании мочи, испражнений, секционного материала без использования сред обогащения (при отсутствии «подозрительных колоний» на пластинчатых средах первичного посева) на 2-й день исследования; с использованием сред обогащения (при отсутствии «подозрительных колоний» на пластинчатых средах, засеянных со сред обогащения) – на 3-й день исследования;

при отсутствии в прямых посевах на пластинчатые среды колоний, дающих агглютинацию на стекле с ОКА сывороткой эшерихий, на 2-й день исследования – выдают ответ об отсутствии эшерихий серологических групп, представленных в ОКА поливалентной агглютинирующей сыворотке.

118. При оценке этиологической значимости выделения УПЭ из клинических материалов, обладающих в норме собственной микрофлорой, могут быть использованы следующие данные:

количественный показатель – наличие установленных УПЭ при посевах на пластинчатые среды из  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  разведения исследуемого материала, т.е. содержание УПЭ –  $10^6$  КОЕ и более 1 г исследуемого субстрата;

повторность выделения идентичных микроорганизмов в значительных, особенно нарастающих количествах и исчезновение в период реконвалесценции;

ответная реакция микроорганизма – нарастание титра антител к обнаруженным УПЭ при исследовании в динамике «парных» сывороток в период до 10-14 дней от начала заболевания.

## ГЛАВА 16 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

### 119. Глицериновый консервант

Состав:

Натрий хлорид (NaCl) 0,85% раствор	- 1000 мл
Глицерин нейтральный	- 500 мл
Натрий гидрофосфат, безводный (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) 20% раствор	- 150 мл

Приготовление: смешивают первые ингредиенты и добавляют раствор гидрофосфата натрия в таком количестве, чтобы довести pH до 7,8-8,0, затем разливают в пробирки или флаконы по 10 мл, стерилизуют в автоклаве при 112<sup>0</sup>С в течение 15 минут или текучим паром 3 дня подряд. После стерилизации pH 7,6-7,8.

## 120. Фосфатно-буферный консервант

Состав:

Калий дигидрофосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	- 0,45 г
Натрий гидрофосфат, безводный ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	- 5,34 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: ингредиенты смешивают, разливают по 10 мл в пробирки или флаконы, стерилизуют в автоклаве при  $121^\circ\text{C}$  30 минут.

## 121. Буферный глицерино-солевой консервант

Состав:

Натрий хлорид ( $\text{NaCl}$ )	- 4,2 г
Калий гидрофосфат ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	- 3,1 г
Калий дигидрофосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	- 1,0 г
Глицерин нейтральный	- 300 мл
Вода дистиллированная	- 700 мл

Приготовление: ингредиенты растворяют, перемешивают, смесь разливают в стерильные пробирки по 5 мл и автоклавируют при  $112^\circ\text{C}$  30 минут. Рекомендуется с целью контроля в процессе хранения раствор подкрашивать феноловым красным.

## 122. Изотонический раствор хлорида натрия

Состав:

Натрий хлорид ( $\text{NaCl}$ )	- 8,5 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: соль растворяют при подогревании, фильтруют, разливают в пробирки по 5-7 мл, стерилизуют при  $121^\circ\text{C}$  30 минут.

## 123. Селенитовая среда обогащения

Состав:

Натрий гидроселенит без примеси теллура ( $\text{NaHSeO}_3$ )	- 4 г
Пептон	- 5 г
Натрий гидрофосфат, безводный ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	- 7 г
Натрий дигидрофосфат, безводный ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	- 3 г
Лактоза	- 4 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: среду готовят из двух основных растворов 1 и 2.

Приготовление основного раствора 1: определяют пропорцию  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  с используемым образцом пептона и гидроселенита натрия для установления pH в пределах 6,9-7,1, с этой целью регулируют соотношение фосфатов. Подтитровка нужна всегда при изменении серии любого из входящих в среду основных ингредиентов.

После установления соотношений фосфатов добавляют пептон и лактозу. Разливают во флаконы по 50 мл и стерилизуют текучим паром два дня по 30 минут. Количество фосфатов в рецепте среды дано в расчёте на безводные препараты. При отсутствии таковых заранее заготовленные навески «выветривают» в термостате в течение 15-16 суток.

Приготовление основного раствора 2: 10% раствор гидроселенита натрия готовят на стерильной дистиллированной воде перед употреблением.

Перед началом работы в каждый флакон с 50 мл основного раствора 1 добавляют 2 мл раствора гидроселенита натрия основного раствора 2, асептически

разливают по 5-7 мл в стерильные пробирки и закрывают плотно пробками. Дальнейшая стерилизация не требуется.

Основной раствор 1 для среды можно хранить в холодильнике 1-2 месяца.

Для получения сред обогащения двойной концентрации, при исследовании жидких материалов, соответственно уменьшают вдвое объём дистиллированной воды.

#### 124. Селенитовый бульон с аминокептидом

Состав:

Бульон аминокептидный	- 960 мл
Натрий гидрофосфат ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	- 8 г
Натрий дигидрофосфат ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	- 2 г
Натрий гидроселенит 10% водный раствор	- 40 мл

Приготовление: реакцию среды не устанавливают, т.к. рН колеблется в пределах 7,1-7,2. Стерилизуют при 112<sup>0</sup>С 20 минут. Непосредственно перед употреблением добавляют 40 мл стерильного 10% водного раствора натрия гидроселенита (рН при этом снижается на 0,1–0,2), среду хорошо перемешивают и асептически разливают в стерильные пробирки по 5 мл.

Фосфаты натрия могут быть заменены калийными в тех же количествах.

#### 125. Приготовление аминокептидного бульона

Состав:

Аминокептид	- 250 мл
Натрий хлорид ( $\text{NaCl}$ )	- 5,5 г
Вода дистиллированная	- 750 мл

Приготовление: среду хорошо перемешивают, стерилизуют при 121<sup>0</sup>С 20 мин. Готовый бульон можно хранить в бутылках неопределённый срок, желательно при 6-10<sup>0</sup>С.

#### 126. Магниева среда

Состав: Готовят три раствора.

Раствор 1.

Пептон	- 4,2 г
Натрий хлорид ( $\text{NaCl}$ )	- 7,15 г
Калий дигидрофосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	- 1,48 г
Дрожжевой диализат	- 9 мл
Вода дистиллированная	- 890 мл

Раствор 2.

Магний хлорид ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )	- 35,7 г
Вода дистиллированная	- 90 мл

Раствор 3.

Бриллиантовый зелёный (0,5% водный раствор)	- 0,9 мл
---	----------

Приготовление: все три раствора смешивают, разливают в необходимых объёмах в колбы, флаконы или пробирки, стерилизуют при 112<sup>0</sup>С 30 минут.

#### 127. Среда Мюллера (тетратионатный бульон Мюллера)

Состав:

Мел, стерилизованный сухим паром или Кальций карбонат ( $\text{CaCO}_3$ ), сухой стерильный	- 45 г  - 25 г
---	----------------------

Бульон Хоттингера, содержащий 120-130 мг% аминного азота	- 900 мл
Раствор Люголя	- 20 мл
Натрий тиосульфат ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) 50 % стерильный раствор	- 100 мл

Приготовление: стерильные флаконы помещают по 4,5 г мела, стерилизуют сухим паром, после чего в каждый флакон наливают по 90 мл бульона Хоттингера. Стерилизуют при  $121^\circ\text{C}$  30 минут, рН 7,2-7,4. Затем асептически добавляют в каждый флакон точно по 2 мл раствора Люголя и по 10 мл раствора натрия тиосульфата, хорошо размешивают и разливают по пробиркам. Готовая среда стерилизации не подлежит.

Приготовление раствора Люголя:

Калий иодид (KI)	- 20 г
Иод кристаллический	- 25 г
Вода дистиллированная	- 100 мл

Приготовление 50% раствора натрия тиосульфата:

в измерительный цилиндр насыпают 50 г натрия тиосульфата и добавляют воду по 100 мл, растворяют, переливают во флакон, стерилизуют текучим паром 30 минут.

#### 128. Среда Кауфмана

Состав:

Среда Мюллера (стерильная)	- 500 мл
Желчь бычья (стерильная)	- 250 мл
Бриллиантовый зелёный (0,1% водный раствор)	- 50 мл

Приготовление: ингредиенты смешивают, асептически разливают в стерильные пробирки по 10 мл, дополнительно не стерилизуют.

#### 129. 20% Желчный бульон

Состав:

Бульон мясопептонный или Хоттингера	- 800 мл
Желчь бычья нативная	- 200 мл

Приготовление: рН - должен быть равен 7,6; разливают в стерильные пробирки или флаконы. Стерилизуют паром два дня по 30 минут.

#### 130. Среда Раппопорт

Состав:

Бульон мясопептонный или Хоттингера	- 900 мл
Желчь бычья нативная	- 100 мл
Глюкоза	- 20 г
Индикатор Андрее	- 10 мл

Приготовление: ингредиенты смешивают, разливают по 50 мл во флаконы с поплавками. Стерилизуют текучим паром три дня по 30 минут.

#### 131. Бульон с 0,2% глюкозы для клебсиелл

Состав:

Бульон питательный рН 7,2-7,4 (стерильный)	- 1000 мл
Глюкоза	- 2 г

Приготовление: в небольшом количестве тёплого бульона растворяют глюкозу, раствор добавляют к остальному бульону, тщательно перемешивают, разливают в стерильные пробирки по 5-6 мл, стерилизуют при 112<sup>0</sup>С 30 минут.

### 132. Буферная среда обогащения для иерсиний

Состав:

Натрий хлорид (NaCl)	- 8,5 г
Натрий гидрофосфат (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O)	
1/15 молярный раствор	- 3 мл
Калий дигидрофосфат (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
1/15 молярный раствор	- 7 мл
Вода дистиллированная	- 990 мл

Приготовление: предварительно готовят по 100 мл 1/15 М растворов указанных солей. Затем к ИХН добавляют необходимое количество приготовленных растворов, смешивают, фильтруют, разливают в пробирки по 5-6 мл и стерилизуют при 116<sup>0</sup>С 10 минут или 30 минут текучим паром, рН среды 7,2.

## ГЛАВА 17

### СРЕДЫ ДЛЯ ПЕРВИЧНЫХ ПОСЕВОВ МАТЕРИАЛА И ВЫСЕВОВ СО СРЕД ОБОГАЩЕНИЯ

133. Среда Плоскирева, ЭМС – агар, Эндо, ВСА выпускают в сухом виде. Среды из сухих препаратов готовят в соответствии с указаниями на этикетках.

Приготовление сред с антибиотиками для выделения шигелл:

питательные среды с антибиотиками готовят путём добавления соответствующих препаратов антибиотиков к среде Плоскирева или ЭМС. Антибиотики могут быть введены в среду путём диффузии их на вкладываемых под питательную среду в чашке Петри полосок фильтровальной бумаги, пропитанных растворами соответствующих антибиотиков («метод полосок»). Полоски размером 4x0,5 см готовят из фильтровальной бумаги, укладывают «ребром» по 200 штук в чашки Петри и стерилизуют в автоклаве при 121<sup>0</sup>С 30 минут, затем подсушивают, пропитывают растворами антибиотиков (левомицетин и тетрациклин в концентрациях 250 мкг/мл, стрептомицин – 500 мкг/мл). Могут быть использованы и другие антибиотики. На смачивание 200 полосок расходуют 12,5 мл раствора антибиотика. Пропитанные раствором антибиотика полоски подсушивают при 37<sup>0</sup>С 18-20 часов. Готовые полоски хранят в банках с притёртыми пробками в холодильнике не более 3-х месяцев.

### 134. Среда «Эт-2» (для выделения эдвардсиелл)

Состав:

Экстракт кормовых дрожжей (ЭКД)	- 20 г
Манит	- 10 г
Глюкоза	- 2,75 г
L- Лизин	- 5 г
или DL – Лизин	- 10 г
Желчные соли (по Олькеницкому)	- 2,5 г
Розоловая кислота (5% спиртовой раствор)	- 2 мл

Железо (III) – аммоний цитрат (смесь солей 1:1)	- 0,8 г
1) железо (III) цитрат ( $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )	
2) аммоний цитрат ( $(\text{NH}_4)_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )	
Натрий тиосульфат ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	- 6,8 г
Агар	- 25 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: в 20 мл воды растворяют тиосульфат натрия и смесь цитратов. Все остальные ингредиенты растворяют в воде при подогревании в водяной бане до полного расплавления агара и добавляют приготовленный раствор солей, затем среду фильтруют, устанавливают рН 6,9-7,1. Стерилизуют при 112<sup>0</sup>С 30 минут, разливают в чашки Петри.

#### 135. Агар Клиглера

Сухая среда готовится в соответствии с указаниями на этикетке препарата. Готовая к употреблению среда имеет красновато-бурый или оранжево-красный цвет, при скашивании следует оставлять столбик высотой 2-2,5 см.

#### 136. Трёхсахарный агар с мочевиной по Олькеницкому

Состав:

Агар питательный сухой	- 25 г
Лактоза	- 10 г
Сахароза	- 10 г
Глюкоза	- 1 г
Аммоний – железо (II) сульфат $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	- 0,2 г
Натрий тиосульфат ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	- 0,3 г
Мочевина	- 10 г
Феноловый красный (0,4% водный раствор)	- 4 мл
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: соли предварительно растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды. Углеводы и мочевины также растворяют в небольших объемах воды при подогревании в водяной бане. Сухой питательный агар расплавляют в небольшом объеме воды при нагревании и помешивании. Затем все ингредиенты соединяют, перемешивают с расплавленным агаром, фильтруют через марлевый фильтр, устанавливают рН 7,2-7,4. Добавляют индикатор, хорошо перемешивают, разливают в пробирки по 6-7 мл. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 20 минут. Скашивают, оставляя столбик 2-2,5 см. Готовая среда бледно-розового цвета.

## ГЛАВА 18 СРЕДЫ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

137. Цитратный агар Симонса – сухая среда, готовится согласно указаниям на этикетке препарата. Среду разливают по 5-7 мл, при скашивании после стерилизации оставляют столбик 2-2,5 см.

#### 138. Ацетатный агар

Сухая среда, готовится согласно указаниям на этикетке препарата.

#### 139. Цитратный агар Кристенсена

Сухая среда, готовится согласно указаниям на этикетке препарата.

## 140. Среда с малонатом

## Состав:

Дрожжевой экстракт жидкий или	- 30 мл
Экстракт сухой	- 1 г
Аммоний сульфат (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- 0,2 г
Калий дигидрофосфат (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	- 0,4 г
Калий гидрофосфат (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	- 0,6 г
Натрий хлорид (NaCl)	- 2 г
Натрий малонат (OH <sub>2</sub> COONCOONa)	- 3 г
Глюкоза	- 0,25 г
Бромтимоловый синий (0,2% водный раствор)	- 12 мл
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: в кипящей воде растворяют ингредиенты в указанной последовательности. После добавления каждого реактива среду доводят до кипения, фильтруют, доводят до первоначального объёма, охлаждают и устанавливают pH 6,7, добавляют индикатор, разливают в серологические пробирки по 2 мл, стерилизуют при 112<sup>0</sup>С 15 минут. Готовая среда имеет бледно-оливковый цвет.

## 141. Агар с фенилаланином

## Состав:

Дрожжевой экстракт жидкий или	- 100 мл
Экстракт сухой	- 3 г
Натрий хлорид (NaCl)	- 5 г
Натрий гидрофосфат (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	- 1 г
L- Фенилаланин	- 1 г
или DL – Фенилаланин	- 2 г
Агар	- 12 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: дрожжевой экстракт вносят в холодную воду, нагревают её, затем последовательно добавляют остальные ингредиенты и кипятят до полного расплавления агара (5-10 мин), фильтруют через ватно-марлевый фильтр и разливают по 2-3 мл в агглютинационные пробирки. pH среды должен быть 7,0-7,2. Стерилизуют при 112<sup>0</sup>С 30 минут и охлаждают в скошенном положении. Готовая среда не окрашена.

Реактив: 10% водный раствор железа (III) хлорида FeCl<sub>3</sub>. Хранят при 4-6<sup>0</sup>С, без доступа света.

## 142. Среда с мочевиной по Кристенсену

## Состав:

Пептон	- 1 г
Натрий хлорид (NaCl)	- 5 г
Калий дигидрофосфат (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	- 2 г
Агар	- 20 г
Глюкоза	- 1 г
Феноловый красный (0,2% водный раствор)	- 6 мл
Мочевина (20% водный раствор)	- 100 мл
Вода дистиллированная	- 1000 мл



Приготовление: пептон, соли и агар растворяют при нагревании, устанавливают рН, фильтруют, стерилизуют при 115<sup>0</sup>С 20 минут. Затем добавляют глюкозу и индикатор, стерилизуют текучим паром 1 час, охлаждают до 50-55<sup>0</sup>С. Раствор мочевины после стерилизации фильтрованием через фильтр Зейтца асептически добавляют к основе. Готовую среду асептически разливают в стерильные пробирки и охлаждают в скошенном положении.

Возможно использование 50% водного раствора мочевины, выдержанного 2-3 суток для «самостерилизации» и добавление к среде из расчёта конечного содержания мочевины в среде 2%.

#### 143. Среда с мочевиной по Преусу

Состав:

Бульон Хоттингера	- 1000 мл
Агар	- 15 г
Глюкоза	- 5 г
Мочевина (50% водный раствор)	- 20 мл
Бромтимоловый синий (0,2% водный раствор)	- 12 мл

Приготовление: агар расплавляют в бульоне при подогревании, фильтруют, устанавливают рН 6,9-7,0. Стерилизуют при 121<sup>0</sup>С 20 минут. К стерильному питательному агару добавляют глюкозу, мочевины, индикатор. Стерилизуют текучим паром однократно 15 минут, после чего скашивают. Цвет готовой среды оливковый.

#### 144. Среда Кларка

Состав:

Пептон	- 5 г
Калий гидрофосфат (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	- 5 г
Глюкоза	- 5 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: ингредиенты растворяют в воде, кипятят 2-8 мин, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 6,9-7,0, разливают в пробирки. Стерилизуют при 121<sup>0</sup>С 20 минут или 3 дня текучим паром по 20 минут.

#### 145. Среды с углеводами

Состав:

Пептон	- 10 г
Натрий хлорид (NaCl)	- 5 г
Индикатор Андрее	- 10 мл
Углевод	- 5 или 10 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

В качестве индикатора рН могут быть использованы растворы бромтимолового синего, фенолового красного или бромтимолового пурпурного.

Для специальных целей среду с лактозой готовят с большим содержанием сахара (2-10%).

К средам может быть добавлен агар (0,2-0,4%).

Приготовление: пептон растворяют в воде при подогревании, добавляют хлорид натрия и индикатор, фильтруют, устанавливают рН 7,1-7,2 стерилизуют при 121<sup>0</sup>С 15 минут. К стерильной основе добавляют соответствующий углевод. Лактозу, глюкозу, маннит или сахарозу добавляют в количестве 1%, а рамнозу,

ксилозу, мальтозу, арабинозу, раффинозу, целлюлозу, дульцит, сорбит, адонит – 0,5%. Среду разливают в стерильные пробирки по 3-4 мл, а в пробирки с глюкозой помещают поплавки (перевернутые бродильные пробирки Дюрхема). Стерилизуют при 110<sup>0</sup>С 30 минут или дробно текучим паром 2 дня подряд по 30 минут.

#### 146. Среда для определения индолообразования

Возможно использование:

бульона на трептическом переваре (1,2-1,4% аминного азота);

бульона на трептическом переваре Хоттингера

(1,2-1,4% аминного азота);

2% пептонной воды;

1% пептонной воды с добавлением 0,2% L-триптофана;

полужидкого агара, приготовленного на бульоне Хоттингера.

#### 147. Среды с аминокислотами – лизином, орнитином и аргинином

Состав:

Пептон	- 5 г
Дрожжевой экстракт жидкий или	- 3 г
Аутолизат дрожжей	- 12-15 мл
Глюкоза	- 1 г
Бромкрезоловый–пурпурный (1,6% спиртовой раствор)	- 0,6 мл
Крезоловый красный - (0,1% спиртовой раствор)	- 5 мл
L – аминокислота	- 10 г
или DL- аминокислота	- 20 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Указанный в оригинальной прописи индикатор рН может быть заменён на бромтимоловый синий (1мл 1,6% спиртового раствора).

Вместо дрожжевого экстракта или аутолизата дрожжей можно брать 400 мл мясной воды, соответственно уменьшив объём дистиллированной воды до 600 мл.

Приготовление: в воде растворяют белковую питательную основу и глюкозу. Устанавливают рН 6,0-6,1. Затем среду делят на 4 равные части. В каждую из трёх порций вносят одну их аминокислот (лизин, орнитин или аргинин) в количестве, зависящем от кристаллизационной формы реактива L или DL). В последнюю порцию питательной основы аминокислот не добавляют, оставляя её в качестве контрольной. Среды кипятят 5-10 минут и вновь устанавливают рН 6,0-6,1. Во все порции вносят раствор индикатора, перемешивают, разливают в агглютинационные пробирки по 2-3 мл. Стерилизуют при 110<sup>0</sup>С 30 минут.

#### 148. Среды с органическими кислотами: D-, L-, I- тартратами, мукатом

Состав:

Основа:

Пептон	- 10 г
Натрий гидроксид (NaOH) 0,1 N раствор	- 8,5 мл
Бромтимоловый синий (0,2% водный раствор)	- 12 мл
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Органические кислоты:

D- тартрат (правовращающая соль винной кислоты)	- 10 г
L- тартрат (левовращающая соль винной кислоты)	- 5 г

I- (или мезо)-тарtrat (оптически инертная соль винной кислоты) - 5 г  
 Мукат - 10 г

Приготовление: готовят основу среды, стерилизуют при 120<sup>0</sup>С 15 минут, добавляют одну из органических кислот, устанавливают рН 7,4, асептически разливают в стерильные пробирки по 5-6 мл и стерилизуют текучим паром 20 минут.

Готовить среду можно иначе: к указанной основе присоединить одну из органических кислот, установить рН 7,4, разлить в пробирки и стерилизовать при 112<sup>0</sup>С 20 минут.

#### 149. Глицерино-фуксиновый бульон Штерна

Состав:

Бульон Хоттингера стерильный, рН 8,0	- 1000 мл
Фуксин основной, насыщенный спиртовой раствор (10%)	- 2,5 мл
Натрий сульфит (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ) (10% водный раствор)	- 16,6 мл
Глицерин нейтральный	- 10 мл

Приготовление: к бульону добавляют спиртовой раствор фуксина, свежеприготовленный 10% раствор сульфита натрия и глицерина, хорошо смешивают, разливают в пробирки по 6-7 мл, стерилизуют при 112<sup>0</sup>С 15 минут. Хранить среду можно в холодильнике не более 14 дней.

#### 150. Среда Ворфеля-Фергюсона

Состав:

Натрий хлорид (NaCl)	- 2 г
Калий сульфат (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	- 1 г
Магний сульфат (MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	- 0,25 г
Сахароза	- 20 г
Дрожжевой экстракт сухой или	- 2 г
Экстракт жидкий	- 88 мл
Агар	- 15 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Примечание: возможно применение жидкой среды (без добавления агара), согласно оригинальной прописи.

Приготовление: агар расплавляют в тёплой воде, добавляют остальные ингредиенты, растворённые в малых количествах воды, хорошо перемешивают, фильтруют, рН не устанавливают, разливают в колбы или флаконы, стерилизуют при 121<sup>0</sup>С 15 минут. Перед употреблением разливают в чашки Петри.

#### 151. Полужидкий агар для определения подвижности

Состав:

Натрий хлорид (NaCl)	- 5 г
Гидролизат Хоттингера	- 120-150 мл
Агар	- 3-4 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: гидролизат Хоттингера разводят водой до содержания в среде 1,2-1,4% аминного азота, добавляют хлорид натрия, устанавливают рН 7,2-7,4, добавляют агар и полностью расплавляют его, подогревая среду при постоянном помешивании. Затем фильтруют в горячем состоянии через тканевый фильтр, проверяют прозрачность (визуально) и, в случае необходимости, осветляют с помощью яичного белка или путём отстаивания в узких сосудах. Среду разливают

по 5 мл в пробирки при 121<sup>0</sup>С в течение 30 минут. Охлаждают в вертикальном положении.

Среда может быть одновременно использована для определения индолообразования.

Возможно применение других питательных сред, систем идентификации и диагностических препаратов, предназначенных для использования описываемых в настоящей Инструкции по применению, зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. При их применении руководствуются рекомендациями производителя.

## ГЛАВА 19 СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ОТ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ДРУГИХ СЕМЕЙСТВ

### 152. Среда для теста на окисление-ферментацию (OF-тест)

Состав:

Пептон	- 2 г
Натрий хлорид (NaCl)	- 5 г
Калий гидрофосфат (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	- 0,3 г
Агар	- 3 г
Бромтимоловый синий (1% водный раствор)	- 3 мл
Глюкоза	- 10 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: среда требует особо тщательного приготовления и использования проверенных ингредиентов. Все вещества, входящие в состав среды, растворяют при подогревании в водяной бане, фильтруют, разливают в пробирки по 5-6 мл и стерилизуют при 118<sup>0</sup>С 10 минут. Готовая среда имеет рН 7,1-7,2.

Другой способ приготовления: приготовленную основу (все компоненты, кроме глюкозы) разливают в пробирки примерно по 5мл и стерилизуют при 121<sup>0</sup>С в течение 15 минут. Глюкозу в виде 10% водного раствора подвергают стерилизующей фильтрации через фильтры Зейтца и добавляют асептически по 0,5 мл в каждую пробирку со стерильной основой, используют после тщательного перемешивания. Допустимо хранение при температуре + 4<sup>0</sup>С 2-3 дня.

### 153. Среда с KNO<sub>3</sub> для определения редукции нитратов

Оригинальная пропись

Состав:

Калий нитрат (KNO <sub>3</sub> )	- 0,2 г
Пептон	- 5 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Приготовление: ингредиенты растворяют, смешивают, устанавливают рН 7,4, разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют при 121<sup>0</sup>С 15 минут.

Модификация

Состав:

Калий нитрат (KNO <sub>3</sub> )	- 0,1 г
Пептонная вода (0,5%)	- 1000 мл
Натрий хлорид (NaCl)	- 2,5 г

Приготовление: 1% пептонную воду разводят вдвое дистиллированной водой, прибавляют хлорид натрия, вносят нитрат калия, все ингредиенты растворяют и хорошо перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 7,1-7,2, разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют при 112<sup>0</sup>С 30 минут.

Нитрат калия (KNO<sub>3</sub>) должен быть свободен от нитратов (KNO<sub>2</sub>).

154. Реактив для реакции с метиловым красным

Состав:

Метиловый красный	- 0,1 г
Спирт этиловый 96 <sup>0</sup>	- 300 мл
Вода дистиллированная	- 200 мл

Приготовление: краску растворяют в спирте, затем добавляют воду до 500 мл.

155. Реактивы для реакции Фогеса-Проскауэра

6% раствор α - нафтола

Состав:

α -нафтол	- 30 г
Спирт этиловый 96 <sup>0</sup>	- 500 мл

40% раствор КОН

Состав:

Гидроокись калия (KOH)	- 120 г
Вода дистиллированная	- 300 мл

Реактив Эрлиха на индол

Состав:

Пара-диметиламинобензальдегид	- 1 г
Спирт этиловый 96 <sup>0</sup>	- 95 мл
Кислота хлористоводородная (HCl) концентрированная	- 20 мл

Приготовление: растворить альдегид в спирте и добавить кислоту. Хранить в тёмном месте.

156. Реактив Ковача на индол

Состав:

Пара-диметиламинобензальдегид	- 5 г
Спирт амиловый	- 75 мл
Кислота хлористоводородная (HCl) концентрированная	- 25 мл

Приготовление: растворить альдегид в спирте при нагревании в водяной бане при 50-55<sup>0</sup>С. Остудить и добавить кислоту. Реактив должен быть жёлтого цвета. Хранить при +4<sup>0</sup>С.

157. Индикаторные бумажки для определения индола

Состав:

Пара-диметиламинобензальдегид	- 5 г
Ортофосфорная кислота (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ), очищенная, Концентрированная	- 10 мл
Спирт метиловый	- 50 мл

Вместо метилового спирта, можно использовать этиловый спирт 96<sup>0</sup> в том же количестве.

Приготовление: в тепловатом растворе ингредиентов смачивают фильтровальную бумагу, высушивают при комнатной температуре и нарезают полосками (0,5 X 6 см). Цвет бумажек жёлтый. Хранить в банке тёмного стекла.

Индикаторные бумажки можно приготовить, используя реактив Ковача или Эрлиха.

158. Реактив для определения редукции нитратов

Раствор А. Состав:

Сульфониловая кислота	- 8 г
Уксусная кислота (5N раствор)	- 1000 мл

Раствор Б. Состав:

$\alpha$ -нафтиламин или	- 5 г
Диметил- $\alpha$ -нафтиламин	- 6 г
Уксусная кислота (5N раствор)	- 1000 мл

Приготовление: ингредиенты растворяют при слабом нагревании. Реактивы токсичны, требуют соответствующего обращения. Хранить их необходимо в склянках тёмного стекла с притёртыми пробками при температуре +4<sup>0</sup>С. Срок годности реактивов 2-3 месяца при периодическом контроле на известных тест-штаммах.

159. Реактивы для определения цитохромоксидазы

Раствор А. Состав:

Спирт этиловый 96 <sup>0</sup>	- 100 мл
$\alpha$ -нафтол	- 1 г
Диметил-пара-фенилендиамина гидрохлорид	- 1 г
Вода дистиллированная	- 100 мл

Примечание: раствор А можно хранить в холодильнике до 10 дней, а раствор Б – только один день.

160. Реактивы для окраски бактерий по Граму

Реактив 1 (для первичной окраски). Состав:

Генцианвиолет или кристалвиолет	- 1 г
Спирт этиловый 96 <sup>0</sup>	- 10 мл
Фенол	- 2 г
Вода дистиллированная	- 100 мл

Приготовление: в ступке растирают краситель с фенолом, постепенно добавляя спирт и воду, сливают во флакон, выдерживают сутки и затем фильтруют через бумажный фильтр.

Реактив 2. Растворы Люголя (в модификации Грама) Состав:

Калий йодид (KI)	- 2 г
Йод кристаллический	- 1 г
Вода дистиллированная	- 300 мл

Приготовление: йод и йодид калия растворяют в 10 мл воды, оставляют на сутки в мерной колбе, после чего добавляют воду до 300 мл.

Реактив 3. Спирт этиловый 96<sup>0</sup>

Реактив 4. Фуксин карболовый, разведённый. Состав:

1. Фуксин основной	- 10 г
Спирт этиловый 96 <sup>0</sup>	- 100 мл

Ингредиенты смешивают и ставят в хорошо закрытом флаконе в термостат на 18-20 часов.

2. Фенол	- 5 г
Вода дистиллированная	- 100 мл

Приготовление: 10 мл спиртового основного фуксина (1) добавляют к 100 мл 5% водного раствора фенола (2), получается крепкий карболовый фуксин, который для работы разводят дистиллированной водой 1:10.

## ГЛАВА 20 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ МАРКЁРОВ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

161. Для усовершенствования методов эпидемиологического обследования и анализа при инфекциях, вызываемых энтеробактериями, характеризующихся большой сложностью и многообразием форм проявления эпидемического процесса, особое значение имеет внутривидовая (внутрисероваровая) дифференциация возбудителей – их эпидемиологическое маркирование.

162. В основу дифференциации (определения эпидмаркеров) могут быть положены различные свойства микроорганизмов, характеризующихся стабильностью: биохимические свойства (биовары), антигенная структура (серовары), чувствительность к бактериофагам (фаговары), колициногенная активность (колициногеновары) или чувствительность к колициноварам, присутствие в штаммах факторов устойчивости к химиотерапевтическим препаратам (R-плазмид определённого типа) и др. У отдельных возбудителей возможно определение ряда эпидмаркеров.

## ГЛАВА 21 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОВАРОВ У НЕКОТОРЫХ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

### 163. Определение сероваров цитробактеров

Определение сероваров возможно у *S. freundii* при помощи специфических O- и H-сывороток в реакции агглютинации на стекле, в соответствии с антигенно-диагностической схемой этих бактерий. Антигенно-диагностическая схема представителей рода *Citrobacter* приведена в приложении 36 к настоящей Инструкции по применению.

Первоначально культуру испытывают поливалентными O-сыворотками: Si0A, Si0B, Si0C, Si0D, Si0G, Si0P, Si0E, каждая из которых включает антитела к ряду O-групп. Например, Si0A, содержит антитела к группам 01,02,03,04,05,06,08; Si0B – 09,010,011,012,013,014 и т.д.

При работе с поливалентными сыворотками целесообразно начинать с сывороток Si0A, Si0B, Si0F, в связи с большей частотой распространения в Республике Беларусь представителей соответствующих серогрупп. При положительном результате реакции агглютинации с одной из поливалентных сывороток продолжают серологическую идентификацию культур с сыворотками к O-антигенам, входящим в состав поливалентной смеси. При наличии положительной реакции агглютинации с одной из данных сывороток устанавливают серологическую O-группу штамма. При агглютинации культуры одновременно с двумя или тремя поливалентными O-сыворотками, содержащими общие антитела, культуру дополнительно испытывают с соответствующими факторными сыворотками и на

основании полученных данных определяют антигенное строение штамма. После установления О-группы определяют Н-антиген с использованием поливалентных и моновалентных Н-сывороток. Для определения О- и Н-антигена в реакции агглютинации на стекле используют 18-20 часовую культуру на СПА.

#### 164. Определение сероваров протеев

Определение сероваров возможно у *P. vulgaris* и *P. mirabilis* при помощи специфических О- и Н-сывороток в реакциях агглютинации на стекле. Сокращённая антигенно-диагностическая схема *P. vulgaris* и *P. mirabilis* приведена в приложении 37 к настоящей Инструкции по применению. Для реакции агглютинации применяют суточную культуру на СПА, которую испытывают вначале с поливалентными, а затем при положительной реакции агглютинации – с моновалентными О-сыворотками, входящими в поливалентную. После установления О-группы определяют Н-антиген, применяя в начале поливалентные, а затем моновалентные Н-сыворотки.

165. При отсутствии диагностических Н-сывороток и необходимости выяснения однородности выделенных штаммов протеев по Н-антигену (при выявлении источника инфекции др.), используют феномен Динеса. Для выявления феномена Динеса хорошо подсушенную чашку с 2% СПА делят пополам, на каждую половину среды (на полюсах диаметра чашки) засевают по одной капле 4-5 часовой бульонной культуры. Чашки с посевами помещают при 37<sup>0</sup>С на 18-20 часов или оставляют на тот же срок при комнатной температуре, после чего учитывают результаты. При наличии двух идентичных по Н-антигену штаммов отмечают слияние зон роста в результате роения. При различных Н-антигенах между обоими участками образуется разграничительная зона шириной в 0,5-2 мм.

Разработана антигенно-диагностическая схема *P. inconstans* (*Providencia*), но производственный выпуск агглютинирующих сывороток отсутствует.

#### 166. Определение сероваров у клебсиелл (*K. pneumoniae*)

Установление сероваров клебсиелл проводят путём определения капсульного (К) антигена в реакции агглютинации на стекле при помощи капсульных К-сывороток. Для получения культуры в капсульной форме исследуемый штамм пассируют через углеводосодержащие среды (0,2% глюкозный бульон и агаровая среда Ворфель-Фергюсона). Культуру засевают в 0,2% глюкозный бульон и инкубируют в течение 4 часов при 37<sup>0</sup>С, после чего пересевают на среду Ворфеля-Фергюсона и инкубируют при той же температуре 18-20 часов.

Для реакции агглютинации петлю агаровой культуры со среды Ворфель-Фергюсона растирают на предметном стекле рядом с каплей соответствующей капсульной клебсиеллёзной сыворотки, после чего их тщательно смешивают. Капсульная агглютинация наступает обычно очень быстро и имеет вид крупных хлопьев. В сомнительных случаях реакция может наблюдаться в нескольких сыворотках при нахождении культуры в ОК- или РК-формах, результат подтверждают в развёрнутой пробирочной реакции агглютинации в разведениях сыворотки 1:2, 1:4. Положительный результат этой реакции оценивают по появлению дискообразного плотного агглютината, всплывающего в виде «зонтика» при встряхивании пробирки, разбиваемого с трудом на крупные хлопья.



Проведение реакции агглютинации и отбор культур в К-форме осуществляют в соответствии с наставлением по применению клебсиеллёзных агглютинирующих диагностических сывороток.

#### 167. Определение серогрупп иерсиний

Определение серогрупп проводят в реакции агглютинации на стекле или в пробирках с кроличьими сыворотками с высокими титрами антител против соответствующих сероваров. Вид *Y.pseudotuberculosis* включает шесть О-групп, но наиболее часто регистрируемыми являются I и затем III и IV О-группы. В связи с этим используют в первую очередь сыворотку против серогруппы О-I. В случае отрицательного результата используют сыворотки О-серогрупп III и IV и затем II, V, VI серогрупп этих микробов. Серологическую идентификацию *Y.enterocolitica* так же, как и псевдотуберкулезного микроба, начинают с использования сыворотки против наиболее распространённых серогрупп 03 и 09, затем 05.27, 08.06 и других, которые могут встретиться у человека. Антигенная структура иерсиний приведена в приложении 38 к настоящей Инструкции по применению.

Из приложения 38 к настоящей Инструкции по применению видно, что по принадлежности к тому или иному биовару возможно предположить принадлежность штамма к той или иной О-серогруппе. Все штаммы *Y.enterocolitica* серогруппы 03 относятся к 4 биовару, 08 и 06 – к 1-му и 09 – к 2-му. Штаммы серогруппы 05.27 относятся к 3 биовару.

## ГЛАВА 22 ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОВАРОВ

#### 168. Определение биоваров шигелл

Антигенная однородность *S.sonnei* и *S.flexneri* 6 исключает их серологическую дифференциацию, поэтому дальнейшее их разделение на биовары осуществляют при использовании жидких сред с углеводами.

Неодинаковая биохимическая активность по отношению к отдельным углеводам некоторых сероваров шигелл других видов, также может быть использована для дифференциации их на биовары.

#### 169. Определение биоваров *S.sonnei*

Дифференциация *S.sonnei* основана на их неодинаковой биохимической активности в отношении рамнозы, ксилозы и мальтозы, что позволяет подразделить их на 7 стабильных биоваров

#### 170. Определение биоваров *S.flexneri* 6

Для определения биоваров у *S.flexneri* 6 (*S.newcastle*) используют неодинаковую ферментацию глюкозы, маннита и дульцита, что позволяет выявить среди них 3 различных биовара. Биовары *S.flexneri* 6 (*S.newcastle*) приведены в приложении 39 к настоящей Инструкции по применению.

#### 171. Определение биоваров *S.flexneri* 1-5, X и Y variant

В зависимости от биохимической активности по отношению к мальтозе, арабинозе, сорбиту и рамнозе *S.flexneri* 1-5, X и Y variant можно подразделить на 15 биоваров. Биовары *S.flexneri* 1-5, X и Y variant приведены в приложении 40 к настоящей Инструкции по применению.

#### 172. Определение биоваров *S.boydii*

Установление биоваров *S.boydii* также как и других шигелл, основано на неодинаковой активности их в отношении отдельных углеводов (сорбит, глицерин, ксилоза, дульцит), что позволяет дифференцировать их на 8 биоваров. Биовары *S.boydii* приведены в приложении 41 к настоящей Инструкции по применению.

#### 173. Определение биоваров сальмонелл

В пределах некоторых сероваров сальмонелл наблюдается различная активность в отношении отдельных углеводов. Для *S.typhimurium*, наиболее широко распространённого серовара, установлены чёткие биовары. Биовары *S.typhimurium* приведены в приложении 42 к настоящей Инструкции по применению.

174. В среды с мукатом и тартратами посев проводят петлёй, используя 18-20 часовую бульонную или агаровую культуру. В тесте с мукатом результаты учитывают через 2-4 суток по изменению цвета среды. Положительный результат – изменение первоначального цвета среды (синий с зеленоватым оттенком) на зеленовато-жёлтый.

175. В тесте с тартратами результат учитывают через 2-4 суток по величине выпавшего осадка через 30 минут, после добавления 0,5 мл насыщенного водного раствора уксусно-кислого свинца (объём среды в пробирке должен быть 3-4 мл). Величина выпавшего осадка при положительном результате незначительная и не превышает  $\frac{1}{4}$  объёма среды. При отрицательном результате осадок обычно занимает  $\frac{1}{2}$  или более объёма среды. Для обеспечения возможности учёта результатов реакции в разные сроки (через 48, 72 и 96 часов) культуру засевают в несколько пробирок.

176. Принимая во внимание, что многие другие серовары сальмонелл, характеризуются вариабельностью биохимической активности по отношению к отдельным углеводам (арабиноза, дульцит, адонит, рамноза, ксилоза) при необходимости они также могут быть подразделены на ряд биоваров. По способности ферментировать ксилозу и арабинозу выделяют 4 ферментативных типа бактерий брюшного тифа:

- тип I (ксилоза +, арабиноза -);
- тип II (ксилоза -, арабиноза -);
- тип III (ксилоза +, арабиноза +);
- тип IV (ксилоза -, арабиноза +).

#### 177. Определение биоваров у некоторых сероваров *E.coli*

Биохимические реакции *E.coli* в отношении отдельных субстратов вариабельны и могут быть использованы для определения биоваров у ряда сероваров. Биовары *E.coli* 0151:K, *E.coli* 0144:K, *E.coli* 0124:K72 приведены в приложениях 43-45 к настоящей Инструкции по применению.

#### 178. Определение биоваров клебсиелл

Различия в биохимической активности *Klebsiella pneumoniae* по отношению к дульциту, сорбозе и D-тартрату могут быть использованы для подразделения их на биовары. Биовары *K. pneumoniae* приведены в приложении 46 к настоящей Инструкции по применению.

#### 179. Определение биоваров *Y.enterocolitica*

В основе определения биоваров у *Y. enterocolitica* стоит неодинаковая биохимическая активность этих бактерий по отношению к трегалозе, D-ксилозе, салицину (или эскулину) и способность образовывать индол, что позволяет подразделить их на 5 различных сероваров. Биовары *Y. enterocolitica* приведены в приложении 47 к настоящей Инструкции по применению.

## ГЛАВА 23 ФАГОТИПИРОВАНИЕ

180. Определение фаговаров у микроорганизмов вообще, в т.ч. и у некоторых энтеробактерий основано на избирательной чувствительности отдельных штаммов одного и того же серовара к набору стандартных типовых бактериофагов, при этом фаговар устанавливают в соответствии с чувствительностью к одному или нескольким определённым типовым бактериофагам, входящим в набор.

181. Определение фаговаров *S. typhi*

Для определения фаговаров *S. typhi* используют стандартную схему с применением 45 препаратов адаптированных Vi II-бактериофагов и неадаптированного Vi I-бактериофага, предназначенного для выявления в культуре Vi-антигена. Бактериофаги и соответствующие им фаговары штаммов обозначают заглавными буквами латинского алфавита (от А до Т включительно), и частично цифрами (от 27 до 46). Условием для определения фаговара культуры является наличие в ней Vi- антигена, с которым связана чувствительность её к Vi-бактериофагам.

182. Если штамм даёт слабую реакцию Vi-агглютинации, а результаты определения фаговара нечёткие, штамм рассеивают и под контролем Vi-сыворотки отбирают колонии, наиболее богатые Vi-антигеном, которые вновь подвергают исследованию на определение фаговара. Для отбора колоний 3-4 часовую бульонную культуру высевают в чашку с СПА.

183. Вторым обязательным условием для определения фаговара является использование типовых Vi II-бактериофагов в рабочих тест-разведениях, которые указывают либо в приложении к набору, либо на этикетках ампул с фагом.

184. Штаммы фаговара А лизируются всеми Vi II-фагами. Подразделение фаговара на подфаговары в группах В,С,Д,Е и т.д. построено таким образом, что штаммы подфаговара с порядковым номером 1 (В1,С1,Д1,Е1 и т.д.) лизируются не только гомологичным фагом, но и всеми другими фагами данной группы.

185. Для штаммов некоторых фаговаров (В1,В2,В3,С) характерна чувствительность к ряду фагов, в т.ч. и неродственных групп.

186. Для проведения этого исследования суточную агаровую культуру изучаемого штамма (после проверки на содержание в ней Vi-антигена с помощью Vi-сыворотки) пересеивают в пробирку с 2-3 мл мартеновского или хоттингеровского бульона (рН 7,0-7,2) и инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С 3-4 час. Фаготипирование трёх сероваров сальмонелл: *S. typhi*, *S. paratyphi* А, *S. paratyphi* В (*S. schottmuelleri*) проводится с использованием соответствующих наборов типовых бактериофагов.

187. Молодую бульонную культуру вносят в чашку Петри с 25-30 мл 1,5-1,7% СПА, хорошо подсушенного. Чашки с агаром готовят накануне, оставляя их в термостате с закрытыми крышками, а на следующий день подсушивают с открытыми крышками в течение 20-30 минут. Культуру вносят на агар в чашке петлём (диаметром 5мм) или тонко оттянутой пастеровской пипеткой в виде отдельных капель. Число капель культуры должно быть на 3 единицы больше числа используемых бактериофагов: одну из них испытывают с Vi 1-фагом, вторую с O-поливалентным сальмонеллёзным фагом и третья капля служит контролем культуры (вместо фага на неё наносят каплю бульона). Культуру можно засеять на чашку в виде газона, на который после подсыхания наносят петлём или тонко оттянутой пастеровской пипеткой. Vi II-бактериофаги в тест-разведениях, а также Vi 1-0-фаги. После подсыхания капель фага чашки оставляют в термостате при 37<sup>0</sup>С и учитывают результаты дважды (через 5-6 часов и 18-20 час.). Учёт проводят невооружённым глазом или с помощью 5-кратной лупы через дно чашки в проходящем свете. Фаговар культуры определяют в соответствии со стандартной схемой. При определении фаговаров возможны результаты отклоняющихся от указанных в схеме:

культура лизируется Vi 1-фагом, но нечувствительна ни к одному из Vi II-бактериофагов. Причина этого: выделение штамма, к которому Vi II-фаги ещё не открыты или отсутствует в используемом наборе; изучаемый штамм относится к тем культурам, к которым Vi II-бактериофаги не могут быть адаптированы (Vi 1-штаммы);

культура содержит Vi-антиген, лизируется несколькими Vi II-фагами, но спектр лизиса не соответствует ни одному из представленных в схеме (полилизабельные, деградированные штаммы), для их успешного исследования рекомендуется изучить несколько колоний (2-4), т.к. некоторые из них могут сохранять признаки определённого фаговара. Нередко полилизабельные культуры проявляют выраженную однотипность в спектре чувствительности к Vi II-бактериофагам, что может быть использовано как эпидмаркер при выделении таких штаммов от разных лиц или других источников;

культуры, не обладающие Vi-антигеном, хорошо лизирующиеся O-фагом и не чувствительные ни к одному из Vi-фагов, обозначают как N-форму.

#### 188. Определение фаговаров *S. paratyphi B*

Для определения фаговаров *S. paratyphi B* используют международную стандартную схему Феликса и Келлоу (10 фагов), дополнённую 5 фагами. С помощью данной схемы удаётся установить 10 основных фаговаров *S. paratyphi B* и 19 постоянных подфаговаров. Определение фаговаров *S. paratyphi B* основано на определении спектра лизиса несколькими фагами. Методика определения фаговаров та же, что и для *S. typhi*, однако для *S. paratyphi B* делают две дополнительные капли культуры (одна для испытания с O-фагом, другая для контроля культуры).

#### 189. Определение фаговаров *S. paratyphi A*

Определение фаговара *S. paratyphi A* осуществляют в соответствии с международной схемой, включающей 6 специфических бактериофагов этих бактерий, обозначаемых арабскими цифрами 1, 2, 3, 4, 5, 6. Схема определения фаговаров *S.*

paratyphi A приведена в приложении 48 к настоящей Инструкции по применению.

Установление фаговара основано на определении чётких спектров изучаемых штаммов *S. paratyphi A* бактериофагами определённых типов (фаговары 3, 5 и 6) или группами фагов (фаговары 1, 2 и 4).

Методика определения фаговаров та же, что для *S. typhi* и *S. paratyphi B*. Следует отметить, что наибольший успех, при определении фаговара *S. paratyphi A* (равно, как при определении фаговара *S. paratyphi B*) достигается в том случае, если изучению подвергается не одна, а несколько (2-4) культур, полученных их отдельных колоний исследуемого штамма.

## ГЛАВА 24

### ТИПИРОВАНИЕ ШИГЕЛЛ ПО КОЛИЦИНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

190. Метод определения колициногенной активности у шигелл основан на свойстве этих бактерий продуцировать колицины с неодинаковым спектром действия на индикаторные бактерии.

191. Метод определения колициногеноваров у *S. sonnei* предусматривает использование 10 индикаторных штаммов (8 штаммов *S. sonnei*, *S. dysenteriae* 2 и одного - *E. coli*) из набора Эббота и Шеннона. С их помощью могут быть установлены 17 колициногеноваров. Ещё 5 индикаторных штаммов (*S. sonnei*) применяют для уточнения характеристик, если результаты определения колициногеновара по основной схеме вызывают сомнения или необходимость их подтвердить.

192. Исследование проводят способом перекрёстных посевов. Для этого точную бульонную культуру штамма сеют на агаровую пластинчатую среду в виде двух параллельных полос, располагающихся по обе стороны предполагаемой линии диаметра чашки, таким образом, чтобы расстояние между полосами посева составляло 3-4 см. В качестве питательной среды (в чашках) применяют приготовленный в лаборатории 1,5% СПА на гидролизате Хоттингера с конечным содержанием аминного азота в среде 130-150 мг% и рН 7,4. С целью предотвращения роста флоры к агару добавляют раствор (2-4 капли 0,1% водного раствора на 100 мл среды), известно что он стимулирует колицинопродукцию.

193. Чашки с посевами инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 48 часов. Этот срок необходим для накопления колицинов в концентрации, достаточной для проявления их действия на индикаторные штаммы. После инкубации в крышку чашки наливают 0,5 мл хлороформа и закрывают её второй половиной той же чашки (с выросшей культурой), выдерживая экспозицию 40–50 мин. Обезвреженную культуру снимают узким краем стерильного предметного стекла, стараясь сохранить целостность агаровой поверхности, далее под прямым углом к линиям посева исследуемого штамма на агар наносят бактериологической петлёй четырехчасовые бульонные культуры индикаторных штаммов в виде поперечных полос. Посевы делают таким образом, чтобы полосы посевов на одной полосе чашки помещались против интервалов между полосами посевов на другой половине чашки. Рекомендуется постоянно соблюдать однотипный порядок расположения посевов индикаторных штаммов, что позволяет не делать специальные пометки на чаш-

ках. При использовании 10 или 15 индикаторных штаммов соответственно делают на каждой половине чашки 6 и 4 или 8 и 7 полос.

194. Чашки с посевами индикаторных штаммов инкубируют при 37<sup>0</sup>С 18-20 часов. При учёте результатов прежде всего необходимо установить, является ли исследуемый штамм колициногенным. Показателем колициногенности является торможение роста индикаторного штамма 44 (*E.coli* –К-12), чувствительного ко всем известным колицинам, кроме колициногена 7 типа (к нему чувствителен штамм 33). Наряду с этим может иметь место торможение роста ещё каких-либо индикаторных штаммов.

195. При изучении спектра зон задержки положительным результатом считают наличие зоны торможения роста индикаторных бактерий более 4 мм. Однако литический спектр может не соответствовать ни одному из условных колициногенов. Такие штаммы обозначают как нетипируемые.

196. При применении метода колициногенотипирования необходимо проводить периодический контроль на стабильность свойств индикаторных штаммов с помощью набора стандартных колициногенных штаммов.

## ГЛАВА 25

### ТИПИРОВАНИЕ ШИГЕЛЛ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К КОЛИЦИНАМ

197. Чувствительность *S.sonnei* и других видов шигелл к колицинам (колициновар) связана со способностью бактерий адсорбировать на рецепторах поверхности клетки определённые колицины; колицины (или группа родственных колицинов) адсорбируются на строго специфических рецепторах.

198. Метод типирования шигелл по чувствительности к колицинам применяют к разным видам шигелл (в целом занимающих одно из первых мест по чувствительности к колицинам среди всех родов энтеробактерий), т.к. они мало отличаются по удельному весу колициночувствительных штаммов. Вместе с тем использование этого метода в эпидемиологических целях ограничено из-за относительной нестабильности колициноваров.

199. Для определения колициноваров используют 11 эталонных колициногенных штаммов из коллекции P.Frederig. Эталонные колициногенные штаммы для определения колициноваров шигелл (P.Fredericg) представлены в приложении 49 к настоящей Инструкции по применению. Перед началом исследования готовят чашки с 1,5% СПА, разливая его по 20-25 мл на чашку с добавлением генцианвиолета (2-4 капли 0,1% водного раствора на 100 мл среды). Определение проводят в двух (дублирующихся) чашках. Дно каждой чашки со средой размечают на 11 квадратов – по числу эталонных штаммов, обозначая их условно 1,2,3 и т.д., соответственно порядковому номеру при использовании этих штаммов. В квадраты сеют последовательно уколом петли суточные бульонные культуры колициногенных штаммов. Чашки с посевами инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 22-24 часов, затем обеззараживают однократно хлороформом. По окончании этой процедуры 2 капли 6-часовой бульонной культуры исследуемого штамма вносят в пробирку с 2,5 мл расплавленного и охлаждённого до 46-48<sup>0</sup>С полужидкого (0,7%) СПА и после перемешивания агар наслаивают на один слой агара. В результате предшествовавшего культивирования посевов эталонных колициноген-

ных штаммов в толще первого слоя агара колицины диффундируют в среду, вокруг макроколоний.

200. Через 16-20 часов инкубации при 37<sup>0</sup>С вокруг макроколоний эталонных штаммов во втором слое агара образуются зоны задержки роста испытуемого штамма, если он колициночувствителен. Штамм считают чувствительным, если величина зоны задержки его роста, измеряемой от края макроколоний эталонного колициногенного штамма до наружного края зоны составляет 2 мм.

201. При оценке результатов учитывают степень чувствительности к колицинам по системе 4 плюсов: зона от 2мм+, от 2 до 5мм++, от 5 до 10мм+++ и более 10мм++++. Для получения чётких результатов имеет значение использование правильно приготовленной агаровой среды, особенно в отношении количественного содержания в среде агара (1,5%), в более плотной среде диффузия колицинов в агар замедляется. Важно также обеспечить равномерное распределение инокулята во втором слое (полужидкого) агара.

202. Изучение спектра лизиса проводят в обеих чашках; если он однороден, типирование считают законченным. При расхождении результатов – исследование повторяют. Дублированное исполнение процедур по колицинотипированию диктуется необходимостью исключения технических погрешностей, могущих влиять на спектр чувствительности к колицинам исследуемого штамма.

203. Установленный колициновар отражает спектр колицинов, к которым исследуемый штамм оказался чувствительным.

## ГЛАВА 26

### МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

204. В качестве эпидмаркеров может быть использована и нередко используется характеристика чувствительности штаммов энтеробактерий к различным антибактериальным лекарственным препаратам, и в первую очередь - к антибиотикам. В данном случае эпидмаркером служит спектр антибиотикорезистентности. Обычно у штаммов, происходящих от эпидемически связанных случаев, спектры резистентности оказываются сходными. Достаточно успешным этот метод маркирования может оказаться при расшифровке вспышек заболеваний, вызванных энтеробактериями, в особенности, если другие методы определения эпидмаркеров не дают желаемого результата.

205. Вместе с тем, следует учитывать, что метод определения чувствительности штаммов энтеробактерий к антибиотикам не всегда достаточно надёжен вследствие возможности генетического обмена у энтеробактерий факторами, контролирующими резистентность, и соответственно возможности изменения антибиотикограмм.

206. Тем не менее, систематическое слежение за чувствительностью выделяемых энтеробактерий на той или иной территории имеет важное не только эпидемиологическое, но и клиническое значение.

207. Установление антибиотикограммы проводят с помощью известных методов определения чувствительности выделенной культуры к антибиотикам, в числе которых наиболее приемлемым для использования в практических услови-

ях является метод диффузии в агар с применением набора стандартных дисков с антибиотиками.

## ГЛАВА 27 СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ И БАКТЕРИОНОСИТЕЛЬСТВА

208. С целью улучшения диагностики заболеваний, вызываемых энтеробактериями, а также при проведении эпидемиологического анализа и выявлении источников инфекции следует применять серологические исследования и, в частности, определять в сыворотке крови антитела к антигенам соответствующих возбудителей. Наибольшее значение серологические исследования приобрели в диагностике брюшного тифа, паратифов и других сальмонеллёзов, в меньшей степени – при дизентерии. В случае выделения УПЭ серологические исследования могут также иметь определённое значение при оценке этиологической роли выделенных микробов.

209. Необходимо учитывать, что наиболее специфичным и чувствительным методом титрования антител является реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (далее – РПГА). Для постановки РПГА с целью выявления антител к О-антигенам возбудителей брюшного тифа, паратифов, других сальмонеллёзов и дизентерии применяют стабильные эритроцитарные диагностикумы. При отсутствии эритроцитарных О-диагностикумов, а также для выявления Н-антител применяют реакцию агглютинации (типа Видаля) с соответствующими О- и Н-диагностикумами. Для серологической диагностики инфекций, вызываемых УПЭ (*Escherichia*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Proteus* и др.), реакцию агглютинации ставят с аутоштаммами.

210. При исследовании любой из указанных в пункте 208 настоящей Инструкции по применению серологических реакций следует учитывать одно принципиально важное обстоятельство. Человеческий организм в течение жизни многократно встречается с различными энтеробактериями и их антигенами, поэтому в крови многих практически здоровых людей могут присутствовать (иногда в значительных титрах) антитела к этим антигенам. Вследствие этого понятие «диагностический» титр определяемых антител носит лишь весьма условный ориентировочный характер. Следует учитывать и то, что для разных районов страны (в связи с особенностями эпидемической ситуации и др.) величина «диагностического» титра будет различной. Её устанавливают в результате титрования сывороток от 100-200 здоровых лиц. Существенно большее диагностическое значение имеет нарастание уровня антител в динамике заболевания, для чего сыворотку нужно брать сразу после выявления больного, а затем в конце первой или в начале второй недели болезни. В более поздние сроки заболевания титр антител к специфическому антигену снижается, что также может служить диагностическим признаком.

211. Значительную помощь для постановки более обоснованного диагноза оказывает определение не только общего (суммарного) титра антител без дифференциации их на классы иммуноглобулинов, но и антител, относящихся к классу иммуноглобулинов G (IgG). Нормальные (так называемые неспецифические), анамнестические и прививочные антитела, особенно к О-антигенам бактерий,



принадлежат в основном к иммуноглобулину М (IgM) и могут содержаться в довольно высоком титре у многих здоровых людей.

212. Определение относительного содержания в сыворотках IgG-антител основано на том, что эти антитела устойчивы к обработке некоторыми редуцирующими веществами и, в частности, цистеином, тогда как IgM-антитела инактивируются данными реагентами.

## ГЛАВА 28

### РЕАКЦИЯ ПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ БРЮШНОГО ТИФА, ПАРАТИФОВ, ДРУГИХ САЛЬМОНЕЛЛЁЗОВ И ДИЗЕНТЕРИИ

213. Кровь берут с соблюдением правил асептики из пальца или из вены в стерильную пробирку. После образования сгустка его отделяют от стенок стеклянной палочкой или пастеровской пипеткой и ставят пробирку в холодильник. Не позднее чем через 24 часа после взятия крови отсасывают сыворотку. Если сыворотка содержит примесь эритроцитов, её центрифугируют.

214. Для постановки реакции прямой гемагглютинации (далее - РПГА) удобно использовать пластмассовые планшеты с лунками, в которых готовят последовательные двукратные разведения исследуемых сывороток. С этой целью вначале в лунки планшета наливают по 0,5 мл ИХН. Отдельно разводят в 50 раз исследуемую сыворотку (например: 0,1 мл сыворотки и 4,9 мл ИХН), 0,5 мл сыворотки в этом разведении вносят в первую лунку. Содержимое лунки тщательно перемешивают градуированной пипеткой и 0,5 мл переносят во вторую лунку, а из второй после перемешивания – в третью и т.д. Обычно достаточно таким способом приготовить ряд из 5-6 разведений (до разведения 1:1600 – 1:3200). Из последней лунки 0,5 мл содержимого выливают и вносят во все лунки чистой пипеткой до 0,25 мл необходимого эритроцитарного диагностикума, ампулу с которым перед этим тщательно взбалтывают до полного исчезновения осадка эритроцитов. С целью экономии диагностикумов их можно вносить (не по 0,25 мл, а по 0,15 мл). Пластины осторожно несколько раз встряхивают до получения гомогенной взвеси эритроцитов и ставят на 2-3 часа в термостат при 37<sup>0</sup>С или на ночь при комнатной температуре, после чего учитывают результат.

215. Контролями диагностикума служат:

постановка реакции со стандартной иммунной сывороткой, вложенной в каждую упаковку диагностикума, – реакция должна быть положительной до разведения, указанного на ампуле с сывороткой;

постановка реакции с 0,5 мл ИХН в двух лунках – реакция должна быть отрицательной.

216. Реакция гемагглютинации считается положительной в том случае, если эритроциты полностью агглютинировались и расположены равномерно по дну лунки, либо наряду с равномерно расположенными небольшая часть эритроцитов оседает в центре лунки в виде ровного колечка или «пуговки». Иногда при положительной реакции края агглютината в лунках могут слегка сползть и он принимает вид «зонтика». При отрицательном результате агглютината нет, а эритроциты оседают в центре лунки в виде «пуговки» или ровного колечка.

217. При необходимости определения IgG-антител следует использовать L- или DL-цистеин как солянокислый, так и «свободный».

Препарат должен быть чистым и содержать воду в виде сульфатов не более 0,2%, аминов – не более 0,05%. Этим требованиям отвечает венгерский цистеин. Непосредственно перед обработкой сывороток готовят раствор цистеина (7 мг на 1 мл растворителя для L-цистеина и 20 мг для DL-цистеина). При этом солянокислый цистеин растворяют в 0,1 нормальном (далее – N) растворе едкого натрия с таким расчётом, чтобы рН готового раствора был равен 7,0-7,2. «Свободный» цистеин сначала растворяют в половинном количестве ИХН, затем доводят рН до 7,0-7,2 0,1N раствором едкого натрия и вновь доливают до нужного объёма ИХН, т.к. «свободный» цистеин значительно слабее, чем солянокислый, сдвигает рН раствора в кислую сторону. Используемый цистеин необходимо предварительно проверить, причем эталоном должен служить другой ранее проверенный цистеин. С целью проверки рН применяют индикаторную бумагу. Раствор цистеина не может храниться длительное время, поэтому следует вначале приготовить необходимое разведение сыворотки.

218. Исследуемую сыворотку в разведении 1:5 смешивают с равным объёмом цистеина, помещают в небольшие пробирки или флаконы и плотно закрывают их резиновыми пробками или лейкопластырем. Объём пробирок (флаконов) должен быть таким, чтобы между содержимым и пробкой оставалось минимальное свободное пространство во избежание инактивации цистеина кислородом воздуха. Пробирки с сыворотками, обработанные цистеином, выдерживают в течение 18-20 часов в термостате при 37<sup>0</sup>С. В таких же условиях выдерживают вторую часть исследуемой сыворотки – (без цистеина), разведённую 1:10 с применением ИХН. На следующий день обе сыворотки титруют, начиная с разведения 1:20. В качестве основы для титрования сывороток, обработанных цистеином, необходимо использовать забуференный ИХН (фосфатный буфер, рН 7,0-7,2), однако предпочтительней готовить ИХН на нормальной, прогретой при 56<sup>0</sup>С в течение 30 минут сыворотке (кроличьей, лошадиной, крупного рогатого скота). Нормальную сыворотку добавляют в соотношении 1: 100 – 1: 200 в ИХН (рН 7,0-7,2) при условии, что в принятом разведении нормальной сыворотки отсутствуют антитела к применяемым диагностикумам. Это проверяют предварительно для каждой новой серии нормальной сыворотки.

219. С целью диагностики брюшного тифа и паратифов сыворотки следует титровать с помощью О-диагностикумов серогрупп А, В и D, а также Н-диагностикумов 1 фазы a,b,d и Vi-диагностикума. Чёткое нарастание в динамике болезни титра суммарных антител к определенным антигенам и особенно увеличение уровня IgG-антител, устойчивых к цистеину, даёт веские основания для подтверждения клинического диагноза. Необходимо учитывать, что при паратифе А титры О-антител на протяжении заболевания могут быть ниже, чем при брюшном тифе и паратифе В.

220. В случае позднего поступления больного в стационар (в разгар болезни) условно диагностическим титром суммарных О- и Н-антител следует считать положительный результат в разведении не ниже 1:640, а для Vi-антител 1:80 – 1:100. Минимальным условно диагностическим титром IgG О- и Н-антител счи-

тают разведение 1:80, а для IgG Vi-антител 1:40 (при паратифе А «диагностические» титры могут быть в 2 раза ниже).

221. При позднем серологическом обследовании больного и отсутствии бактериологического подтверждения диагноза целесообразно исследовать сыворотку в периоде реконвалесценции, чтобы выявить снижение общего титра антител и уменьшение удельного содержания цистеиноустойчивых IgG-антител, что также может помочь поставить правильный диагноз.

222. С целью диагностики сальмонеллёзов сыворотки вначале титруют с комплексным диагностикумом (серогрупп А, В, С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub>, D и E). При нарастании уровня антител или достаточно высоком титре (для взрослых не ниже 1:400, для детей до полугода – 1:100, для детей от 6 месяцев до 1 года – 1:200), следует повторить исследование сыворотки со всеми группами O-диагностикумов и поставить РПГА с цистеиновой пробой. Это необходимо для уточнения этиологии заболевания и потому, что комплексный диагностикум недостаточно специфичен. Условно диагностическим титром антител считают положительный результат реакции в разведении 1:400, а цистеиноустойчивых IgG-антител 1:80 (для детей до 1 года 1:20).

223. С целью диагностики дизентерии сыворотки титруют с эритроцитарными диагностикумами Флекснера (из *S.flexneri* 1-5), Зонне (из *S.sonne* 1), Ньюкасл (из *S.flexneri* 6), Григорьева–Шига (из *S.dysenteriae* 1) и Штуцера–Шмитца (из *S.dysenteriae* 2). Минимальным условно-диагностическим титром к диагностикуму Флекснера для взрослых считают положительный результат реакции в разведении 1:400, для детей до 3 лет – 1:100, старше 3 лет – 1:200, для остальных диагностикумов – 1:200, в связи с большим числом неспецифических результатов этой реакции, в особенности в отношении диагностикумов Флекснера и Зонне, достоверным положительным результатом следует считать не менее, чем четырёхкратное нарастание титра в динамике заболевания, а также наличие титра цистеиноустойчивых антител 1:80 и выше.

224. РПГА с цистеином может оказаться полезной для постановки правильного диагноза в случаях смешанной инфекции и при выделении двух или нескольких представителей энтеробактерий, этиологическая роль каждого из которых не ясна. При истинной микст-инфекции антитела и особенно цистеиноустойчивые будут нарастать к каждому из предполагаемых возбудителей. Если же к какому-то из предполагаемых возбудителей, нарастание антител, и в том числе IgG, не будет выявлено, и при этом отсутствуют клинические симптомы заболевания, то можно считать, что выделение возбудителя носит случайный, транзиторный характер.

225. В случае формирования острого и особенно затяжного бактерионосительства (при брюшном тифе, паратифах, реже при сальмонеллёзах и других инфекциях) характерно выраженное нарастание IgG-антител, при этом основное значение имеет не абсолютный титр антител, а относительное содержание в сыворотке цистеиноустойчивых антител. Если обработка цистеином не снижает титр, либо снижает его только на одно, максимум на два разведения, это свидетельствует о значительном содержании в сыворотке IgG-антител, у такого обследуемого следует заподозрить острое или хроническое бактерионосительство (при отсутствии клинических проявлений). При длительном бактерионосительстве

титр О-антител может быть и низким (иногда 1:20 – 1:40), но эти антитела практически целиком определяются IgG-антителами. Для хронических носителей бактерий характерны довольно высокие титры Vi-антител в большинстве случаев выше 1:80) и Н-антител (1:320 и выше), которые почти не снижаются при обработке цистеином.

226. РПГА с цистеином может быть применена с целью контроля прекращения бактерионосительства. Если на фоне прекратившегося бактериовыделения значительно снизится титр антител и особенно цистеиноустойчивых IgG, то можно предположить что произошло освобождение организма от возбудителя. Прекращение бактерионосительства чаще наблюдается при дизентерии, сальмонеллёзах, значительно реже – при брюшном тифе.

227. Для транзиторных бактерионосителей характерен невысокий титр антител, обусловленный IgM. Если после обработки цистеином в сыворотке остаются IgG-антитела в титре 1:40 и выше, то у такого лица можно предполагать наличие либо субклинической формы инфекции, либо продолжающееся бактерионосительство.

228. Некоторое повышение титра IgG-антител может происходить в результате многократной специфической вакцинации, поэтому при анализе результатов реакции следует учитывать прививочный анамнез. При выдаче ответа указывают: «Реакция гемагглютинации с диагностикумом ..... отрицательная»; Реакция гемагглютинации с диагностикумом ..... положительная до титра .....»; «Реакция гемагглютинации с цистеиновой пробой с диагностикумом ..... отрицательная»; «Реакция гемагглютинации с цистеиновой пробой с диагностикумом ..... положительная до титра.....».

## ГЛАВА 29

### РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ДИАГНОСТИКУМАМИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ БРЮШНОГО ТИФА, ПАРАТИФОВ, ДРУГИХ САЛЬМОНЕЛЛЁЗОВ И ДИЗЕНТЕРИИ

229. Исследуемые сыворотки разводят тем же способом, что и для РПГА, только в пробирках. В каждый ряд агглютинационных пробирок с разведениями сыворотки и в контрольную (с 0,5 мл ИХН) добавляют по 2 капли соответствующего диагностикума, штатив с пробирками несколько раз встряхивают и помещают в термостат при 37<sup>0</sup>С на ночь. Учёт результатов реакции рекомендуется проводить с помощью агглютиноскопа, осторожно встряхивая осадок или медленно наклоняя пробирку. При положительной реакции осадок равномерным слоем покрывает дно пробирки. Края его часто бывают неровные (форма «зонтика»). Надосадочная жидкость прозрачна. После лёгкого встряхивания пробирки в прозрачной надосадочной жидкости всплывают хлопья или зерна агглютината. Последнее разведение сыворотки, в котором наблюдают хорошо выраженную агглютинацию, считают её титром. При отрицательной реакции взвесь сохраняет исходную мутность так же, как в контроле диагностикума.

230. Условно диагностическим титром считают положительный результат реакции агглютинации с брюшнотифозными и другими сальмонеллёзными диагностикумами в разведении 1: 200, с диагностикумами Флекснера – 1:400, Зонне,

Ньюкасл, Григорьева – Шига, Штуцера-Шмитца – 1:100. Необходимо помнить, что эти титры не могут служить достоверным доказательством заболевания. Значительно более надёжными следует считать увеличение титров в динамике болезни.

231. В ответе указывают: «Реакция агглютинации с диагностикумом ..... отрицательная»; «Реакция агглютинации с диагностикумом ..... положительная до титра.....».

### ГЛАВА 30

#### РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ С АУТОШТАММАМИ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЯМИ

232. Диагностическая ценность данной реакции в значительной мере связана с выделением характера антителообразования в динамике заболевания. Оптимальные сроки взятия сыворотки – 1-2, 7-10, 14-15-й дни заболевания. Полученные от больного сыворотки следует сохранять в холодильнике и исследовать одномоментно («парные сыворотки»). При специфическом иммунном ответе в конце первой – начале второй недели болезни титр антител нарастает не менее чем в 4 раза, а затем постепенно снижается.

233. При выделении подвижных культур представителей родов *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* и др., сыворотку больных исследуют на Н-и О-антитела.

234. Для Н-агглютинации культуры выращивают на свежескошенном СПА в течение 18 часов, затем смешивают ИХН и доводят взвесь бактерий до густоты 1 млрд/мл в ряду из 5 обычных агглютинационных пробирок с 0,25 мл ИХН, титруют исследуемую сыворотку, начиная с разведения 1:50, после чего вносят в каждую пробирку, включая одну контрольную, с 0,25 мл ИХН по 0,25 мл приготовленной бактериальной взвеси. Штатив с пробирками встряхивают и помещают в термостат при 37<sup>0</sup>С на ночь. Учитывают реакцию, осторожно покачивая пробирку. Агглютинат имеет вид хлопьев. При невозможности взятия сывороток в динамике болезни ориентировочным титром считают положительный результат реакции Н- агглютинации в разведении 1:100 – 1:200.

235. Для О-агглютинации используют взвесь убитой кипячением суточной агаровой культуры бактерий густотой в 3 млрд/мл ИХН.

236. Перед постановкой реакции бактериальную взвесь необходимо 2-3 раза отмыть путём центрифугирования. Исследуемую сыворотку титруют в объёме 0,5 мл, начиная с разведения 1:10 на ИХН в серологических пробирках. В каждую пробирку, включая контрольную, вносят по 1 капле приготовленной бактериальной взвеси, штатив встряхивают и помещают в термостат при 37<sup>0</sup>С на 18-20 часов. В случае положительной реакции О-агглютинат при осторожном встряхивании имеет мелкозернистый характер. При невозможности обследования больного в динамике и получении лишь одной сыворотки 5 дня болезни условно-диагностическим титром считают положительную реакцию в разведении 1:20 и выше.

237. В ответе указывают: «Реакция агглютинации с аутоштаммом ..... отрицательная»; «Реакция агглютинации с аутоштаммом ..... положительная до титра .....».

Приложение 1  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Классификация семейства Enterobacteriaceae  
(Определитель бактерий Берджи, 1997 г.)

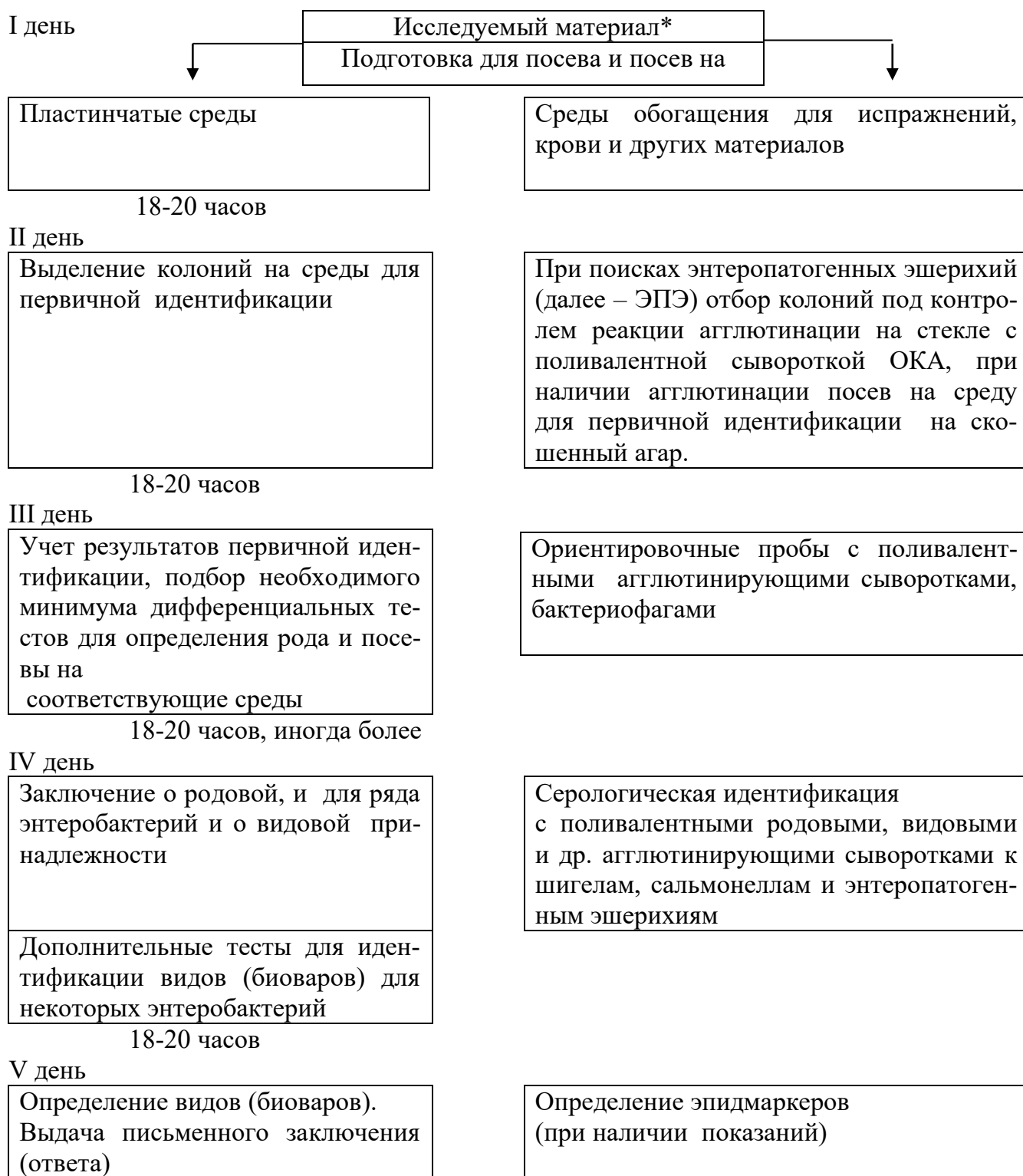
Род	Вид	Род	Вид	
1	2	3	4	
Escherichia	E.coli	Salmonella	S.choleraesuis	
	E.adecarboxylata		S.hirschfeldii	
	E.blattae		S.typhi	
	E.hermanii		S.paratyphi	
	E.vulneris		S.schottmuelleri	
	E.fergusonii		S.typhimurium	
Edwardsiella	E.tarda		S.enteritidis	
	E.istaluri		S.gallinarum	
	E.hoshinae		S.salamae	
Citrobacter	C.freundii		S.arizonae	
	C.diversus		S.houtenae	
	C.amalonaticus		S.bongori	
Shigella	S.dysenteriae		S.ficaria	
	S.flexneri		Proteus	P.vulgaris
	S.boydii			P.mirabilis
	S.sonnei			P.myxofaciens
	P.pennori			
Klebsiella	K. pneumoniae subspation (далее- subsp.) pneumoniae	Providencia	P.alcalifaciens	
	K. pneumoniae subsp. ozaenae		P.stuartii	
	K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis		P.rettgeri	
	K.oxitoca		P.rustigianii	
	K.planticola	Morganella	M.morganii	
	K.terrigena		Yersinia	Y.pseudotuberculosis
	Enterobacter			E.cloacae
E.aerogenes		Y.enterocolitica		
E.taylorae		Y.rohdei		
E.gergoviae		Y.mollaretii		
E.dissolvens		Y.ruckeri		
E.amnigenus		Y.intermedia		
	E.hormaechei	Y.frederiksenii		
		Y.bercovieri		

	E.sacazaki		Y.kristenii
	E.intermedium		Y.aldovae
	E.asburiae	Rahnella	R.aquatilis

1	2	3	4
Hafnia	H.alvei	Xenorhabdus	X.nematophilus
Serratia	S.marcescens		X.luminescens
	S.liquefaciens	Cedecea	C.davisae
	S.rubidaea		C.lapagei
	S.plymutica	Tatumella	T.ptyseos
	S.proteamaculans	Arsenophonus	A.nasoniae
	S.odorifera	Budvicia	B.agrestis
	S.fonticola	Ewingella	E.americana
Erwinia	E.amylovora	Leclercia	L.adecarboxylata
	E.ananas	Leminorella	L.grimontii
	E.salicis		L.richardii
	E.casticida	Moellerella	M.wisconsensis
	E.tracheiphila	Pantoea	P.agglomeranc
	E.chrysantemii		P.dispersa
	E.nigrifluens	Pragia	P.fontium
	E.quercina	Yokenella	Y.regensburgei
	E.rubrifaciens		
	E.stewartii		
	E.persicinas		
	E.uredovora		
	E.psidii		
	E.cypripedii		
	E.rhapontici		
	E.caratovora		
E.mallotivora			
Obssumbac- terium	O.proteus		
Kluyvera	K.ascorbata		
	K.creyoerescens		

Приложение 2  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Схема микробиологического исследования на энтеробактерии



\*Для некоторых материалов (мокрота, спинномозговая жидкость, гной и т.п.) целесообразна предварительная бактериоскопия.



Приложение 3  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика забо-  
леваний, вызываемых энтеробактериями»

Показания к микробиологическим исследованиям  
различного клинического материала

Исследуемый материал	Показания к исследованию	Сроки взятия проб
1	2	3
Испражнения	Ранняя диагностика острых кишечных заболеваний, в том числе с целью подтверждения диагноза при клиническом диагнозе брюшного тифа, паратифов, и подтверждение клинического диагноза. По эпидемическим показаниям, профилактические обследования декретированных контингентов.	С начала заболевания. Период реконвалесценции.  По усмотрению врачей-эпидемиологов территориальных органов и учреждений государственного надзора.
Кровь	Ранняя диагностика брюшного тифа, паратифов. Лихорадочные состояния неустановленной этиологии. Клиническая картина сепсиса.  Ранняя диагностика сальмонеллезов.	С начала заболевания  По указанию врачей ЛПО. По указанию врачей ЛПО. По усмотрению врачей ЛПО и врачей-эпидемиологов территориальных органов и учреждений государственного надзора.
Моча	При клиническом диагнозе брюшного тифа, паратифов с целью подтверждения диагноза Выявление бактерионосителей.  Острые и хронические гнойно-воспалительные заболевания мочевыводящей системы неустановленной этиологии	В конце 2-й недели.  По указанию врачей-эпидемиологов территориальных органов и учреждений государственного надзора. По усмотрению врачей ЛПО.

1	2	3
Желчь и дуоденальное содержимое	Выявление носителей сальмонелл  Острые и хронические гнойно-воспалительные заболевания желчевыводящей системы неустановленной этиологии	По указанию врачей - эпидемиологов территориальных органов и учреждений госсаннадзора. По усмотрению врачей ЛПО
Рвотные массы и промывные воды	Клинические проявления гастроэнтерита	В остром периоде
Соскоб розеол	Для подтверждения клинического диагноза брюшного тифа и паратифов, как вспомогательный метод (при отсутствии гемо-, копро- и уринокультур)	При наличии розеол
Гной, пунктаты органов, экссудат	Наличие местных гнойно-воспалительных процессов в организме, осложняющих течение основного заболевания или в отсутствии такового.	По усмотрению врачей ЛПО
Спинномозговая жидкость	Менингеальный синдром при заболеваниях неустановленной этиологии	По усмотрению врачей ЛПО
Отделяемое ран, шейки матки, мокрота, слизь из зева, носа, уха	Наличие гнойно-воспалительных процессов в соответствующих органах	По усмотрению врачей ЛПО
Секционный материал	При необходимости подтверждения прижизненного клинического диагноза, ретроспективная диагностика при отсутствии прижизненного диагноза.	В первые 6-8 часов после установленного факта смерти

Приложение 4  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика  
заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Питательные среды для первичного посева в соответствии с исследуемым материалом

Исследуемый материал	Энтеробактерии и их ассоциации, которые могут содержаться в исследуемом материале	Плотные среды для выделения							Среды (бульоны) обогащения					
		Плоскирева	ВСА	с антибиотиками	ЭМС	Эндо	по методу подвижного роста	Эт-2	магниевая	селенитовая	Мюллера или Кауфмана	желчный бульон или среда Рапопорт	глюкозный бульон	буферная (для иерсиний)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Испражнения	Shigella	+		+	+	+								
	Salmonella	+	+		+	+	+		+	+	+			
	Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Hafnia, Serratia, Erwinia	+			+	+								
	Citrobacter	+	+		+	+								
	Proteus	+												
	Y.enterocolitica, Y.pseudotuberculosis				+	+								+
	Edwardsiella		+						+					

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Кровь	S.disenteriae 1, Escherichia, Citrobacter, Enterobacter				+	+								
	S.tuphi, S. paratyphi A, S.paratyphi B, редко другие серовары				+	+						+		
	Klebsiella				+	+							+	
	Proteus	+												
	Y.enterocolitica, Y.pseudotuberculosis				+	+								+
Рвотные массы, промывные воды желудка	S. sonnei	+		+	+	+								
	Salmonella	+	+		+	+			+	+	+			
	Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Hafnia	+			+	+								
	Citrobacter,	+	+		+	+								
	Proteus	+												
Желчь, дуоденальное содержимое	Salmonella	+	+		+	+								
	Escherichia, Klebsiella, Enterobacter	+			+	+								
	Proteus	+												
	Y.enterocolitica				+	+								+
Моча	Salmonella	+	+		+	+			+	+	+			
	Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia	+			+	+								
	Citrobacter	+	+		+	+								
	Proteus	+												
	Y.enterocolitica, Y.pseudotuberculosis				+	+								+
Гной	Salmonella	+	+		+	+			+	+	+			
	Escherichia, Klebsiella, Enterobacter	+			+	+								
	Citrobacter	+	+		+	+								
	Proteus	+												
	Y.enterocolitica, Y.pseudotuberculosis				+	+								+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Спинно-мозговая жидкость	Salmonella				+	+						+		
	Escherichia, Klebsiella, Enterobacter				+	+								
	Y.enterocolitica, Y.pseudotuberculosis				+	+								+
Соскоб с розеол	S.typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B				+	+						+		
Операционный материал	Salmonella	+	+		+	+			+	+	+			
	Citrobacter	+	+		+	+								
	Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Erwinia	+			+	+								
	Y.enterocolitica, Y.pseudotuberculosis				+	+								+
Слизь из носа и зева; мокрота, отделяемые из цервикального канала	Salmonella	+	+		+	+			+	+	+			
	Citrobacter,	+	+		+	+								
	Klebsiella, Enterobacter	+			+	+				+			+	
	Y.enterocolitica, Y.pseudotuberculosis				+	+								+
Женское грудное молоко	Salmonella	+	+		+	+			+	+	+			
	Klebsiella	+			+	+								
Секционный материал	Shigella	+		+	+	+								
	Salmonella	+	+		+	+			+	+	+			
	Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Hafnia	+			+	+								
	Citrobacter	+	+		+	+								
	Proteus	+							+					
	Y.enterocolitica, Y.pseudotuberculosis				+	+								+

Примечание. Условные обозначения: «+» - рекомендуемая среда

Приложение 5  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Характеристика колоний энтеробактерий различных родов

Род	Характеристика колоний на питательных средах.
Shigella	<p>на средах Плоскирева, Эндо, на среде с ЭМС небольшие (1-1,5 мм в диаметре), бесцветные, слегка выпуклые, с ровным краем и блестящей поверхностью, прозрачные. <i>S. dysenteriae</i> 1 формируют более мелкие и нежные колонии, а на среде Плоскирева растут скудно (I фаза);</p> <p><i>S. sonnei</i> на средах Эндо, ЭМС образуют иногда кроме описанных (I фаза) и колонии более крупные плоские, с неровным краем, напоминающие виноградный лист (II фаза);</p> <p>на СПА <i>S. sonnei</i> нередко образуют колонии I и II фаз</p>
Salmonella	<p>на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС размер колоний чаще 2-2,5 мм в диаметре, иногда 1 мм, слегка выпуклые, с ровным краем и гладкой поверхностью;</p> <p>на среде Плоскирева колонии бесцветные, мутноватые, уплотненные;</p> <p>на среде Эндо колонии обычно прозрачные, слегка розоватые;</p> <p>на среде ЭМС колонии обычно прозрачные, с небольшим фиолетовым оттенком;</p> <p>на СПА колонии голубоватые, нежные прозрачные;</p> <p>на ВСА - черные, с характерным металлическим блеском, среда под колониями прокрашена в черный цвет, колонии <i>S. paratyphi</i> A зеленоватые, светлые, нежные</p>
Escherichia	<p>на среде Плоскирева рост значительно подавляется; на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС более крупные, чем колонии шигелл и сальмонелл, многообразные по окраске, плотности и форме; могут быть выпуклые или плоские, с ровным или слегка волнистым краем, непрозрачные или полупрозрачные и слегка опалесцирующие, влажные или сухие, иногда слизистые, напоминающие колонии клебсиелл, а также более нежные и прозрачные, похожие на колонии шигелл и сальмонелл; у лактозоположительных штаммов на среде Эндо - темнокрасные с металлическим блеском или без него, розовые или с бесцветным ободком и интенсивно красным или розовым центром, а на среде ЭМС - темносиние с металлическим блеском или розовые; у лактозоотрицательных штаммов – под цвет среды или с розоватым оттенком (на Эндо и ЭМС), а на среде Плоскирева – с желтоватым оттенком</p>
Citrobacter	<p>на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС более крупные, чем колонии шигелл и сальмонелл, выпуклые; у лактозоотрицательных штаммов - слегка опалесцирующие, в тон среды или с розоватым оттенком; у лактозоположительных штаммов - интенсивно розовые или красные с темным центром, но не давшие характерного для эшерихий металлического блеска; рост колоний сопровождается резким неприятным запахом;</p> <p>на ВСА колонии светло-зеленые, коричневые или черные</p>

Klebsiella	на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС большие (диаметр 3 мм), выпуклые, влажные, слизистые, нередко сливающиеся друг с другом или менее крупные, неслизистые, сухие; колонии лактозоположительных штаммов сходны с колониями эшерихий, с металлическим блеском или без него; колонии могут быть красные, розовые, белые, прозрачные, бесцветные, с белым ободком в сочетании с темным или розовым центром, и на среде Плоскирева могут быть большие и желтые
Yersinia	на средах Эндо, ЭМС в течение первых суток роста (при 22 <sup>0</sup> С) колонии мелкие (росинки), обычно выпуклые, блестящие, бесцветные, с ровным краем; в течение вторых суток становятся крупнее, при этом колонии <i>Y.enterocolitica</i> (на ЭМС) фиолетовые с металлическим блеском, могут приобретать розовый оттенок, а <i>Y.pseudotuberculosis</i> остаются неокрашенными; на СПА в первые сутки (при 22 <sup>0</sup> С) колонии <i>Y.enterocolitica</i> небольшие, блестящие, прозрачные, голубоватые, мягкой консистенции, у <i>Y.pseudotuberculosis</i> – полупрозрачные, беловато-желтые, при 37 <sup>0</sup> С колонии более крупные, менее прозрачные, с исчерченной поверхностью волнистым или исчерченным краем, желтоватые
Enterobacter	на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС по размеру, форме и окраске сходные с колониями эшерихий и клебсиел
Hafnia	на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС полупрозрачные, бесцветные или имеющие оттенок среды, розоватые, сероватые; на среде Плоскирева дают скудный рост и нередко напоминают колонии шигелл
Serratia	на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС бесцветные, по размеру и форме трудно различимые от колоний шигелл или сальмонелл; на СПА колонии многих штаммов продуцируют пигмент розового, красного или фуксинового цвета
Proteus	на среде Плоскирева 2-3 мм в диаметре, прозрачные и полупрозрачные слегка выпуклые и с желтовато-розовым (перламутровым) оттенком, вокруг колоний желтоватый ореол; на средах Эндо и ЭМС <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , проявляя способность роения, дают сливной рост, другие виды образуют колонии, сходные с колониями сальмонелл или шигелл, колонии <i>P. insonatans</i> весьма сходны с колониями шигелл; на ВСА через 48 часов роста колонии влажные грязнокоричневого цвета, после их снятия на среде остается темнокоричневая редукционная зона
Edwardsiella	на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС бесцветные или слегка розоватые (на Эндо), полупрозрачные, сходные с колониями сальмонелл или шигелл; на ВСА колонии темные без металлического блеска и почернения среды под ними; на среде Эт-2 – малинового цвета с черным центром
Erwinia	на средах Плоскирева, Эндо, ЭМС при 37 <sup>0</sup> С не растут или дают замедленный скудный рост; при 25-27 <sup>0</sup> С (оптимальной температуре культивирования) колонии с разнообразными характеристиками, более всего сходные с колониями эшерихий

Приложение 6  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика  
заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Первичная идентификация энтеробактерий по биохимическим реакциям в комбинированной среде и выбор тестов для установления родовой принадлежности

Реакция в среде Олькеницкого, Клиглера				Предполагаемые энтеробактерии	Тесты и субстраты для установления рода энтеробактерий
лактоза (или) саха- роза <sup>xx</sup>	глю- коза	серо- водород	моче- вина <sup>xxx</sup>		
1	2	3	4	5	6
-	к	-	-	Shigella, некоторые се- рвары сальмонелл	подвижность (при 37 <sup>0</sup> и 22 <sup>0</sup> С), индол, натрия ацетат, фе- нилаланиндезаминаза, мочевины (по Преусу, по Кристен- сену), лизиндекарбоксилаза, реакция Фогеса-Проскауэра и проба с метиловым красным (при 22 <sup>0</sup> С), пробы с поли- валентными сальмонеллезными и дизентерийным фагами, серологические пробы с поливалентными сыворотками к сальмонеллам и шигеллам
-	кГ	-	-	S.paratyphi А и неко- торые другие серова- ры сальмонелл, неко- торые биовары S.flexneri 6, Escherich- ia, Hafnia, P. incon- stans, Serratia	подвижность (при 37 <sup>0</sup> и 22 <sup>0</sup> С) индол, натрия ацетат, фе- нилаланиндезаминаза, лизиндекарбоксилаза, мочевины (по Преусу, по Кристенсену), реакция Фогеса-Проскауэра и проба с метиловым красным (при 22 <sup>0</sup> С), пробы с поли- валентными сальмонеллезным и дизентерийным фагами, серологические пробы с поливалентными сыворотками к сальмонеллам и шигеллам



1	2	3	4	5	6
-	к	+	-	S.typhi и некоторые другие серовары сальмонелл	проба с поливалентным сальмонеллезным фагом и поливалентными сыворотками к сальмонеллам; инозит
-	кг	+	-	Salmonella, Citrobacter, Edwardsiella	индол, сорбит, лизиндекарбоксилаза, пробы с поливалентным сальмонеллезным фагом и поливалентными сыворотками к сальмонеллам
+	к	-	-	Escherichia, Citrobacter или не энтеробактерии	цитрат Симонса, мочевины (по Преусу или Кристенсену), реакция нитратов, цитохромоксидаза
+	кг	-	-	Escherichia, Citrobacter Klebsiella, Enterobacter Serratia	цитрат Симонса, подвижность, индол, реакция Фогеса-Проскауэра и проба с метиловым красным, лизиндекарбоксилаза, орнитиндекарбоксилаза, мочевины (по Преусу или Кристенсену)
+	кг	-	-	Citrobacter	тесты для внутривидовой дифференциации рода приведены в приложении 27 к настоящей Инструкции по применению
н	н	н	+	Proteus (кроме P. inconstans), Yersinia	фенилаланиндезаминаза
н	г	н	+	Proteus (кроме P. inconstans)	тесты для внутривидовой дифференциации родов приведены в приложениях 32 и 34 к настоящей Инструкции по применению
-	-	-	-	не энтеробактерии	тесты приведены в приложении 7 к настоящей Инструкции по применению
+	-	-	-	не энтеробактерии	

Примечание. Сведения по роду *Erwinia* не включены, так как при обычном (37<sup>0</sup>С) культивировании посевов на пластинчатых средах энтеробактерии рода *Erwinia* не растут или дают замедленный скудный рост. Условные обозначения: «+»-положительная реакция, указывающая на ферментацию лактозы и (или) сахарозы, образование сероводорода, гидролиз мочевины; «-»-отрицательная реакция по тем же тестам; «к»-ферментация глюкозы без газообразования; «г»-газообразование; «кг»-ферментация глюкозы с газообразованием; «хх» - учет реакции невозможен при использовании среды Клиглера; «ххх» - учет реакции невозможен при использовании среды Клиглера, проводят параллельный высеv в среду с мочевиной (по Преусу или по Кристенсену); «н» - учет реакции невозможен.

Приложение 7  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Дифференциация энтеробактерий от некоторых других грамотрицательных микроорганизмов

Микроорганизмы	Морфология	OF-тест	Цито-хромоксидаза	Нитрат-редуктаза
1	2	3	4	5
Enterobacteriaceae	небольшие полиморфные палочки; подвижные (перитрихи) или неподвижные; без капсулы или с капсулой	F	-	+
Pseudomonas	прямые или изогнутые одиночные палочки; подвижные (моно или лопотрихи); без капсул, часто образующие пигмент синего, зеленого, фиолетового или др. цвета	O	+	x
Vibrio	короткие изогнутые или прямые палочки, одиночные или образующие S-образные нити, спирали; подвижные (монотрихи), без капсул	F	+	+
Aeromonas	прямые палочки с закругленными концами или кокковидные; располагаются поодиночке, парами, цепочками; подвижные (монотрихи) или неподвижные	F	+	+
Plesiomonas	прямые палочки, располагаются поодиночке, парно или цепочками; подвижные (лопотрихи)	F	+	+
Flavobacterium	тонкие палочки или кокковидные формы; подвижные (перитрихи) или неподвижные	O или -, F	+	x
Moraxella	однородные или полиморфные, короткие толстые палочки, часто кокковидные; неподвижные	-	+	x
Alcaligenes	одиночные палочки, кокковые или кокковидные формы; подвижные (перитрихи)	-	+	x
Acinetobacter	короткие толстые палочки или кокковидные формы; парно или цепочками; неподвижные; без капсулы или с капсулами	O или -	-	-

Примечание. Условные обозначения: «+»-положительная реакция; «-»-отрицательная реакция; «O»-окисление; «F»-ферментация; «x»-различные результаты реакции.

Приложение 8  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний,  
вызываемых энтеробактериями»

Дифференциация родовых групп Enterobacteriaceae по биохимическим  
свойствам при использовании минимального дифференцирующего ряда

Тест или субстрат		Escherichia	Shigella	Salmonella	Citrobacter	Klebsiella	Enterobacter	Hafnia	Serratia	Proteus	Yersinia	Edwardsiella	Erwinia	
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Комбини- рованная среда	Сероводород	-	-	+,-	+,-	-	-	-	-	+,-	-	+	-,+	
	Лактоза	+,-	-	-,+	x	+	+	-,+	-,+	-	-	-	x	
	Глюкоза (газ)	+,-	-	+,-	+	+	+	+,-	-,+	+,-	-	+	-	
	Мочевина	-	-	-	x	-	(+),-	-	x	+,-	+,(+)	-	-	
Минимальный дифференци- рующий ряд	Мочевина (по Преусу или Кристенсену)	-	-	-	x	(+),+	(+),-	-	x	+,-	+	-	-	
	Подвижность	+,-	-	+,-	+	-	+	x	+	+,-	-	+	+	
	Индол	+,-	-,+	-	-,+	-,+	-	-	-	+,-	x	+	-	
	Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	x	
	Цитрат Симонса	-	-	+,-	+	+	+	x	+	x	-	-	+	
	Ацетат натрия	+,(+)	-	x	x	+	+	-,(+)	x	x	x	x	x	
	Лизиндекарбоксилаза	+,-	-	+,-	-	+	-,+	+	+	-	-	+	-	
	Орнитиндекарбоксилаза	x	-,+	+	x	-	+	+	+	-,+	x	+	-	
	Среда Кларка	реакция с метиловым красным	+	+	+	+	-,+	-	+	x	+	+	+	-
		реакция Фогеса-Проскауэра	-	-	-	-	+,-	-	+	x	+	+	+	-
	Сорбит	x	x	+	+	+	+	-	+	-,+	x	-	x	

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «+,(+))» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «-,(+))» - чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция; «-,+» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «+,-» - чаще положительная, реже отрицательная реакция; «(+),+» - чаще замедленно положительная, реже положительная реакция; «(+),-» - чаще замедленно положительная, реже отрицательная реакция; «x» - различные результаты реакции.

Приложение 9  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика забо-  
леваний, вызываемых энтеробактериями»

Расширенная характеристика биохимических свойств родовых групп Enterobacteriaceae

Тест или субстрат	Escherichia	Shigella	Salmonella	Citrobacter	Edwardsiella	Klebsiella	Enterobacter	Hafnia	Serratia	Proteus	Yersinia	Erwinia
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Цитрат Симонса	-	-	+,-	+	-	+	+	x (37 <sup>0</sup> C) + (22 <sup>0</sup> C)	+	x	-	+
Мочевина	-	-	-	x	-	(+),+	(+),-	-	x	+,-	+	-
Малонат натрия	-	-	-,+	-,+	-	+	+,-	x	-	-	-	x
Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	x
Сероводород	-	-	+,-	+,-	+	-	-	-	-	+,-	-	+
Подвижность	+,-	-	+,-	+	+	-	+	x (37 <sup>0</sup> C) + (22 <sup>0</sup> C)	+	+,-	-(37 <sup>0</sup> C) + (22 <sup>0</sup> C)	+,-
Индол	+,-	-,+	-	-,+	+	-,+	-	-	-	+,-	-	-
Реакция с метиловым крас- ным	+	+	+	+	+	-,+	-	+(37 <sup>0</sup> C) -(22 <sup>0</sup> C)	+(37 <sup>0</sup> C)	+	+	-
реакция Фогеса-Проскауэра	-	-	-	-	-	+,-	+	x (37 <sup>0</sup> C) + (22 <sup>0</sup> C)	x (37 <sup>0</sup> C)	-	-	x

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Лизиндекарбоксилаза	+, -	-	+, -	-	+	+	-, +	+	+	-	-	-
Аргининдигидролаза	x	-, +	(+), +	x	-	-	+, -	-	-	-	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	x	-, +	-	x	+	-	+	+	+	-, +	x	-
Глютаминовая кислота	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Желатин	-	-	-, (+)	-	-	-	-, (+)	-	+	x	-	+
KCN	-	-	-, (+)	+	-	+	+	+	+	+	-	x
Ацетат натрия	+, (+)	-	x	x	x	+	+	-, (+)	x	x	x	x
Цитрат Кристенсена	x	-	+	+	+	+	+	+	+	x	.	.
Целлобиоза	-	-	x	x	-	+	+	x	x	x	+	x
Газообразование из глюкозы	+, -	-, +	+, -	+	+	+	+	x	x	x	-	-
Адонит	-, +	-	-	-	-	+	x	-	x	-, +	x	-
Арабиноза	x	x	+	+	-	+	+	+	-	-	x	+
Глицерин	+	x	+	+	.	+	-, +	+	+	+	.	x
Дульцит	x	x	+, -	x	-	-, +	x	-	-	-	-	-
Инозит	-, +	-	x	-, +	-	+	-, +	-	x	-, +	x	
Ксилоза	x	x	x	+	.	+	+	+	x	+, -	x	x
Лактоза	x	-, (+)	-, +	x	-	+	+	x	-, +	-	-	x
Мальтоза	x	x	+	+	.	+	+	+	+	+, -	+	+
Маннит	+	+, -	+	+	-	+	+	+	+	-, +	+	+
Рамноза	x	x	x	+	-	+	+	+	-	x	+, -	+
Раффиноза	x	x	-, +	x	-	+	+	-	-	-	-	.
Салицин	x	-	-	x	-	+	x	x	+	x	+, -	x
Сахароза	x	-	-	+	-	+	+	x	+	x	-, +	x
Сорбит	x	x	+	+	-	+	+	-	+	-, +	x	x

Примечание. Приведены свойства, характерные для *K.pneumoniae*, *Erwinia herbicola*, рода *Yersinia* за исключением *Y.pestis*.

Условные обозначения: «.» - не изучено; «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «+, (+)» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «-, (+)» - чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция; «-, +» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «+, -» - чаще положительная, реже отрицательная реакция; «(+), +» - чаще замедленно положительная, реже положительная реакция; «(+), -» - чаще замедленно положительная, реже отрицательная реакция; «x» - различные результаты реакции.

Приложение 10  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Результаты основных биохимических реакций на комбинированных средах в минимальном дифференцирующем ряду

Тест или субстрат	Реакция через 18-24 часа культивирования при 37 <sup>0</sup> С		Максимальные сроки учета результатов в случаях замедленных реакций
	положительная	отрицательная	
1	2	3	4
Подвижность	помутнение среды, диффузное или в отдельных участках вдоль укола	среда остается прозрачной, рост строго по ходу укола	2 суток (с инкубацией посевов при 22 <sup>0</sup> С)
Сероводород (в среде Олькеницкого или Клингелера)	почернение в разной степени по всей среде или в отдельных участках	отсутствие почернения в среде	1сутки
Индол (с применением индикаторной бумажки)	покраснение индикаторной бумажки	отсутствие изменения цвета индикаторной бумажки	2 часа
Фенилаланиндезаминаза	зеленое окрашивание агаровой поверхности среды после добавления нескольких капель 10% раствора железа (III) хлорида (FeCl <sub>3</sub> )	отсутствие изменения цвета	1 сутки
Мочевина по Преусу*	синее окрашивание среды	пожелтение среды	2 суток
Мочевина по Кристенсену	малиновое окрашивание среды	отсутствие изменения цвета	4 суток
Ацетат натрия*	наличие роста и синее окрашивание среды	отсутствие роста и изменения цвета среды	4 суток (редко до 7 суток)
Цитрат Симонса*	наличие роста и синее окрашивание среды	отсутствие и роста и изменения цвета среды	4 суток (редко до 14суток)

1	2	3	4
Реакция с метиловым красным в среде Кларка	красное окрашивание среды после добавления реактива метилового красного	желтое окрашивание среды после добавления реактива метилового красного	2-4 суток
Реакция Фогеса-Проскауэра	вишневое окрашивание среды после добавления реактивов (альфа-нафтола и КОН)	отсутствие изменения цвета среды после добавления реактивов (альфа-нафтола и КОН)	2-4 суток
Среды с аминокислотами (лизинном, орнитинном, аргининном)	синее (при индикаторе бромтимол синий) или фиолетовое (при индикаторе бромкрезол пурпуровый) окрашивание среды при отсутствии указанных окрашиваний в контрольной пробирке	отсутствие синего (фиолетового) окрашивания сред с аминокислотами, желтое окрашивание в контрольной пробирке	4 суток
Малонат натрия*	синее окрашивание среды	отсутствие изменения цвета	2 суток
Цитрат Кристенсена	розово-красное окрашивание среды	отсутствие изменения цвета	4 суток
Желатин	разжижение среды, не исчезающее после часового охлаждения в холодильнике (4-6 <sup>0</sup> С)	отсутствие разжижения среды или его исчезновение после часового охлаждения в холодильнике (4-6 <sup>0</sup> С)	30 суток
Среды с углеводами	синее или розовое, красное (в зависимости от индикатора) окрашивание среды	отсутствие изменения цвета	30 суток

\* Указаны изменения цвета при индикаторе бромтимоловый синий.

Приложение 11  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний,  
вызываемых энтеробактериями»

Классификация бактерий рода *Shigella*

Подгруппа	Вид	Серовар	Подсеровар	Сокращенная антигенная формула
A	<i>S. dysenteriae</i>	1-12	-	
B	<i>S. flexneri</i>	1	1a	I:4
			1b	I:6
		2	2a	II:3,4
			2b	II:7,8
		3	3a	III: (3,4),6,7,8
			3b	III:(3,4),6
			4a	IV: 3,4
		4	4b	IV:6
			5a	V:3,4
		5	5b	V: 7,8
		6	-	VI:-
		x-variant	-	-: 7,8
		Y-variant	-	-: 3,4
C	<i>S. boydii</i>	1-18	-	
D	<i>S. sonnei</i>	-	-	



Приложение 12  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика забо-  
леваний, вызываемых энтеробактериями»

Дифференциация видов *Shigella*  
по биохимическим свойствам

Тест или суб- страт	<i>S. disenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>		<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
		серовары 1-5	серовар 6		
Маннит	-	+	+, -	+	+
Глюкоза (газ)	-	-	-, +	-	-
Лактоза	-	-	-	-	(+)
Индол	-, +	-, +	-	-, +	-
Глицерин	х	-	+, (+)	+, (+)	х
Орнитин	-	-	-	-	+, (+)
Сорбит	х	х	х	х	-
Дульцит	-	-	х	х	-
Ксилоза	х	-	х	х	х
Рафиноза	-	-	-	-	х

Примечание. *S. disenteriae* 5 ферментируют дульцит, *S. boydii* 6 и 14 может образовывать газ из глюкозы, *S. boydii* 13 декарбоксилируют орнитин, *S. boydii* 9 может замедленно ферментировать лактозу. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «(+))» - замедленная положительная реакция; «+, (+))» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «-, +» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «+, -» - чаще положительная, реже отрицательная реакция; «х» - различные результаты реакции.

Приложение 13  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биохимические свойства сероваров *S. dysenteriae*

Серовар	Индол	Дульцит	Рамноза	Ксилоза	Сорбит	Арабиноза
1	-	-	-	-	-	-,+
2	+	-	+	-	x	-,+
3	-	-	-	-	+,(+)	+,(+)
4	-	-	-	-	-,(+)	-,(+)
5	-	+,(+)	-	-	-,(+)	+
6	-	-	-	-	+,(+)	-,+
7	+	-	-,(+)	-	-	+
8	+	-	-	+	-	+
9	-	-	-	-,(+)	-,+	+
10	-	-	-	+	+,(+)	+
11	-	-	-	(+)	(+)	+
12	-	-	-,+	(+)	(+)	+

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «(+))» - замедленная положительная реакция; «+,(+))» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «-,(+))» - чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция; «-,+))» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «x» - различные результаты реакции.

Приложение 14  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биохимические свойства сероваров *S. flexneri*

Серовар	Индол	Сорбит	Рамноза
1	-,+	-,+	-
2	-,+	-,+	-
3	+,-	x	x
4	+,-	x	x
5	+,-	x	-
x-variant	+,-	+,-	-,(+)
Y-variant	-,+	-,+	-,(+)

Примечание. Условные обозначения: «-» - отрицательная реакция; «+))» - чаще положительная, реже отрицательная реакция; «+,(+))» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «-,(+))» - чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция; «-,+))» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «x» - различные результаты реакции; «+,-))» - чаще положительная, реже отрицательная реакция.

Приложение 15  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биохимические свойства сероваров *S.boydii*

Серовар	Индол	Дульцит	Ксилоза	Сорбит
1	-	-	(+),+	(+),+
2	-	-	-	-,(+)
3	-	x	x	+
4	-	-,(+)	-	x
5	+	-	(+)	+,(+)
6	-	(+)	+	+,(+)
7	+	-	+	+,(+)
8	-	-	x	+,(+)
9	+	-	-	+,(+)
10	-	x	x	x
11	+	-,(+)	+,(+)	x
12	-	-	-	x
13	+	-	-	+,(+)
14	-	-	(+),+	+,(+)
15	+	-	-	+,(+)
16	+	-	+	-
17	+	-	+	+,(+)
18	-	-	(+)	(+)

Примечание. Условные обозначения: «+» положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «(+))» - замедленная положительная реакция; «+,(+))» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «(+),+» - чаще замедленно положительная, «-,(+))» - чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция; реже положительная реакция; «-,+» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «x» - различные результаты реакции.

Приложение 16  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Схема определения биоваров *S.sonnei*

Биовар	Ферментация углеводов (в сутках)		
	рамноза	ксилоза	мальтоза
Ia	+(1)	-	+(1-2)
Ib	+(1)	-	+(более2)
IIg	+(более1)	-	+(1-2)
IIe	+(более1)	-	+(более2)
IIIд	+(1)	+(1)	+(1-2)
IIIс	+(1)	+(1)	+(более2)
Ivf	+(1)	+(2 и позже)	+(1 и позже)

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция.

Приложение 17  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Дифференциация подродов *Salmonella* по биохимическим свойствам

Тест или субстрат	Подроды			
	I	II	III	IV
Дульцит	+	+	-	-
Лактоза	-	-	+	-
Салицин	-	-	-	+
Малонат натрия	-	+	+	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция.

Приложение 18  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Сокращенная схема Кауфмана-Уайта

Группа	№	Серотип	О-антиген	Н-антиген	
				1-я фаза	2-я фаза
1	2	3	4	5	6
O:2(A)	1	S.Paratyphi A	<u>1,2,12</u>	a	[1,5]
O:4(B)	2	S.Paratyphi B	<u>1,4,[5],12</u>	b	1,2
	3	S.Typhimurium	<u>1,4,[5],12</u>	i	1,2
	4	S.Stanley	<u>1,4,[5],12,27</u>	d	1,2
	5	S.Heidelberg	<u>1,4,[5],12</u>	r	1,2
	6	S.Reading	<u>1,4,[5],12</u>	e,h	1,5
	7	S.Derby	<u>1,4,[5],12</u>	f,g	[1,2]
	8	S.Abortusequi	4,12	-	e,n,x
	9	S.Abortus ovis	4,12	c	1,6
	10	S.Brandenburg	4,[5],12	l,v	e,n,z <sub>15</sub>
	11	S.Bispebjerg	<u>1,4,[5],12</u>	a	e,n,x
	12	S.Abony	<u>1,[5],12,27</u>	b	e,n,x
	13	S.Kisangani	<u>1,4,[5],12</u>	a	1,2
	14	S.Altendorf	4,12,27	c	1,7
	15	S.Saintpaul	<u>1,4,[5],12</u>	e,h	1,2
	16	S.Stanleyville	<u>1,4,[5],12,27</u>	z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub>	[1,2]
	O:7(C <sub>1</sub> )	17	S.Paratyphi C	6,7,[Vi]	c
18		S.Choleraesuis	6,7	c	1,5
19		S.Thompson	6,7,14	k	1,5
20		S.Virchow	6,7,14	r	1,2
21		S.Oranienburg	6,7,14	m,t	[z <sub>57</sub> ]
22		S.Potsdam	6,7,14	l,v	e,n,z <sub>15</sub>
23		S.Tennessee	6,7,14	z <sub>29</sub>	[1,2,7]
24		S.Isangi	6,7,14	d	1,5
25		S.Bareilly	6,7,14	y	1,5
26		S.Infantis	6,7,14	r	1,5
O:8 (C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> )	27	S.Newport	6,8,20	e,h	z <sub>2</sub> : [z <sub>57</sub> ]
	28	S.Bovismorbificans	6,8,20	r,[i]	1,5
	29	S.Glostrup	6,8	z <sub>10</sub>	e,n,z <sub>15</sub>
	30	S.Muenchen	6,8	d	1,2: [z <sub>57</sub> ]
	31	S.Kentucky	8,20	i	z <sub>6</sub>
	32	S.Chailey	6,8	z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub>	[e,n,z <sub>15</sub> ]
	33	S.Sandow	6,8	f,g	e,n,z <sub>15</sub>

1	2	3	4	5	6
O:9 (D <sub>1</sub> )	34	S.Typhi	9,12,[Vi]	d	-
	35	S.Enteritidis	<u>1</u> ,9,12	g,m	-
	36	S.Dublin	<u>1</u> ,9,12,[Vi]	g,p	-
	37	S.Rostock	<u>1</u> ,9,12	g,p,u	-
	38	S.Moscow	9,12	g,q	-
	39	S.Sendai	<u>1</u> ,9,12	a	1,5
	40	S.II	<u>1</u> ,9,12	l,w	e,n,x
	41	S.Eastbourne	<u>1</u> ,9,12	e,h	1,5
	42	S.Panama	<u>1</u> ,9,12	l,v	1,5
	43	S.Gallinaram	<u>1</u> ,9,12	-	-
O:1,3,19(E <sub>4</sub> )	44	S.London	3,10[ <u>15</u> ]	l,v	1,6
	45	S.Anatum	3,10[ <u>15</u> ] [ <u>15</u> ,34]	e,h	1,6
	46	S.Lexington	3,10[ <u>15</u> ] [ <u>15</u> ,34]	z <sub>10</sub>	1,5
	47	S.Weltevreden	3,10[ <u>15</u> ]	r	z <sub>6</sub>
	48	S.Meleagridis	3,10[ <u>15</u> ] [ <u>15</u> ,34]	e,h	1,w
	49	S.Give	3,10[ <u>15</u> ] [ <u>15</u> ,34]	[d],l,v	1,7
	50	S.Amager	3,10[ <u>15</u> ]	y	1,2
	51	S.Muenster	3,10[ <u>15</u> ] [ <u>15</u> ,34]	e,h	1,5
	52	S.Nyborg	3,10[ <u>15</u> ]	e,h	1,7
O:1,3,19(E <sub>4</sub> )	53	S.Senftenberg	1,3,19	g,[s],t	-
O:11 (F)	54	S.Aberdeen	1 1	i	1,2
	55	S.Rubislaw	1 1	r	e,n,x
O:13 (G)	56	S.Worthington	<u>1</u> ,13,23	z	1,w
	57	S.Poona	<u>1</u> ,13,22	z	1,6: [z <sub>44</sub> ]
O:6,14 (H)	58	S.Carrau	6,14,[24]	y	1,7
	59	S.Onderstepoort	1,6,14,[25]	e,h	1,5
	60	S.Buzu	[1],6,14,[25]	i	1,7
O:16 (I)	61	S.Hvittingfoss	16	b	e,n,x
	62	S.Gaminara	16	d	1,7
O:17 (J)	63	S.Kirkee	17	b	1,2
O:21 (L)	64	S.Minnesota	21	b	e,n,x
O:28 (M)	65	S.Kuessel	28	i	e,n,z <sub>15</sub>
O:30 (N)	66	S.Urbana	30	b	e,n,x
O:35 (O)	67	S.Adelaide	35	f,g	-
O:38 (P)	68	S.Inverness	38	k	1,6
O:39 (Q)	69	S.Champaign	39	k	1,5
O:40 (R)	70	S.Riogrande	40	b	1,5
	71	S.Millesi	1,40	l,v	1,2
O:41 (S)	72	S.Waycross	41	Z <sub>4</sub> ,Z <sub>23</sub>	[e,n,z <sub>15</sub> ]
O:42 (T)	73	S.Weslaco	42	Z <sub>36</sub>	-
O:43 (U)	74	S.Ahuza	43	k	1,5
O:44 (V)	75	S.Niarembe	44	a	1,w
O:45 (W)	76	S.Deversoir	45	c	e,n,x
O:47 (X)	77	S.Kaolack	47	z	1,6
O:48 (Y)	78	S.Dahlem	48	k	e,n,Z <sub>15</sub>
O:50 (Z)	79	S.II 50	50	z	e,n,x

1	2	3	4	5	6
0:52	80	S.Utrecht	52	d	1,5
0:53	81	S.II 53	53	Z4,Z24	-
0:54	82	S.Uccle	3,54	g,s,t	-
0:55	83	S.II 55	55	k	Z39
0:57	84	S.II 57	57:	Z29	Z42
0:58	85	S.II 58	58	l,Z13,Z28	1,5
0:59	86	S.II 59	59	k	[Z65]
0:60	87	S.II 60	60	z:	e,n,x
0:61	88	S.IIIb 61	61	i	z
0:62	89	S.IIIa 62	62	Z4, Z32	-
0:63	90	S.IIIa 63	63	g,Z51	-
0:65	91	S.IIIb 65	65	Z10	e,n,x,Z15
0:66	92	S.V 66	66	Z35	-
0:67	93	S.Crossness	67	r	1,2

Приложение 19  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Дифференциация подродов *Salmonella* с однотипной антигенной структурой по биохимическим свойствам

Серovar	Антигенная структура	Биохимические свойства
S.paratyphi B ( <i>S. schottmulleri</i> )	1,4,5,12; b; 1,2	ацетат - D-тарtrat -
S.java	1,4,5,12; b; 1,2	ацетат + D-тарtrat +
S. mission S.isangi	6,7; d; 1,5 6,7; d; 1,5	инозит - инозит +
S. choleraesuis	6,7; c; 1,5	арабиноза - трегалоза- D-тарtrat +
S. typhisuis	6,7; c; 1,5	арабиноза + трегалоза+ D-тарtrat -
S. enteritidis variant jena	1,9,12;	глицерин (бульон Штерна)+
S.enteritidis variant ratin	1,9,12;	глицерин (бульон Штерна)-

Приложение 20  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Внутривидовая идентификация рода *Escherichia*

Тест или субстрат	<i>E.coli</i>	<i>E.hermanii</i>	<i>E.vulneris</i>	<i>E.fergusonii</i>	<i>E.blattae</i>
Индол	+	+	-	+	-
Орнитин	+/-	+	-	+	+
Сахароза	+/-	-/+	-	-	-
Дульцит	+/-	(+)/-	-	+	-
Адонит	-	-	-	+	-
Сорбит	+/-	-	-	-	-
Малонат натрия	-	-	+/-	-/+	+
Целлобиоза	-	+	+	+	-
Желтый пигмент	-	+	+/-	-	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «+/-» - или «-/+» - разные биовары; «(+)/-» - замедленная или слабо выраженная реакция.



Приложение 21  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Основные биохимические свойства бактерий вида *E.coli*

Тест или субстрат	Биохимические реакции
Глюкоза (газ)	+, -
Лактоза	+, -, (+)
Сероводород	-
Мочевина	-
Цитрат Симонса	-
Индол	+, -
Лизиндекарбоксилаза	+, -, (+)
Реакция с метиловым красным	+
Реакция Фогеса-Проскауэра	-
Малонат натрия	-
Ацетат натрия	+, (+)
Желатин	-
Цитрат Кристенсена	x
Орнитиндекарбоксилаза	x
Аргининдегидролаза	x
Фенилаланиндезаминаза	-
Подвижность	+, -
Маннит	+
Инозит	-, +
Адонит	-, +
Сахароза	x
Арабиноза	x
Рафиноза	x
Рамноза	x

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «+, (+)» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «+, -, (+)» - чаще положительная, реже отрицательная реакция или замедленная положительная реакция; «-, +» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «+, -» - чаще положительная, реже отрицательная реакция; «x» - различные результаты реакции;

Приложение 22  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Состав поливалентных ОК – сывороток для серологической  
идентификации энтеропатогенных эшерихий

Наименование диагностического препарата	Отдельные ОК-сыворотки, входящие в поливалентную смесь
ОКА (антитела к 22 серогруппам)	018 вс: К77, 020:К84, 025:К11, 026:К60, 033:К, 044:К74, 055:К59, 075:К, 086а:К61, 0111ав: К58, 0114: К90, 0119:К69, 0124:К72, 0125:К70, 0126:К71, 0127:К63, 0128авс:К67, 0142:К86, 0143:К, 0144:К, 0151:К-, «408»
ОКВ (антитела к 4 серогруппам)	020:К84, 026: К60, 055:К59, 0111ав: К58
ОКС (антитела к 7 серогруппам)	033:К, 086в: К61, 0119: К69, 0125: К70, 0126: К71, 0127:К63, 0128 авс: К67
ОКД (антитела к 9 серогруппам)	018ас:К77, 025:К11, 044:К74, 075:К,
ОКЕ (антитела к 5 серогруппам)	0124:К72, 0142:К86, 0148:К, 0144:К, 0151:К-

Примечание. Полученный ориентировочно положительный результат с отдельной ОК-сывороткой необходимо подтвердить в реакции агглютинации на стекле.

Приложение 23  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Препараты для окончательной серологической  
идентификации энтеропатогенных эшерихий  
в реакции агглютинации на стекле

Антиген для реакции агглютинации	Наименование препаратов
Живая культура	Диагностические ОК-эшерихиозные иммуноглобулины: 020:К84, 025:К11, 055:К59, 0111:К 58, 075:К, 0124:К72, 0142:К, 0143:К, 0144:5
Гретья культура	Адсорбированные О-эшерихиозные сыворотки групповые : 018, 020, 025,026,044,055, 0111, 0112, 0124, 0142, 0143, 0144 и факторные: 018,0112

Приложение 24  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Антигенно-диагностическая схема известных  
разновидностей энтеропатогенных эшерихий

№ п/п	ОК-группа	Н- антигены, определяющие серовары
1	018ac:K77	1,4,7,8,10,11,12,16,26,30,32
2	020:K84	9,10,19,25,26,34
3	025:K11	6,12,30
4	026:K60	2,6,7,8,9,10,11,12,14,16,18
5	088:K	2,6,7,10,11,21,25
6	044:K74	4,12,18,32,34
7	055:K59	1,2,4,6,7,8,10,11,12,19,21,25,27,32,33,34,39
8	075:K	
9	086a:K61	2,6,7,8,9,10,11,12,18,21,26,27,34,47
10	0112ac:K66	Н-*
11	0111аб:K58	2,4,6,7,11,12,16,20,21,25,27,30,32,34,40 «635»
12	0114:K90	4,10,21,32
13	0119:K69	1,2,4,5,6,8,9,11,18,25,27,32,39,40
14	0124:K72	2,12,16,19,30,32,38
15	0125:K70	2,4,6,7,10,11,12,15,19,21,25,30,32,40
16	0126:K71	2,5,7,9,10,11,12,19,20,21,25,27,29,30,33,34,45
17	0127:K63	1,4,5,6,9,11,19,21,26,27,33,40, «635»
18	0128абс:K67**	2,6,7,8,9,10,11,12,16,19,21,27,35
19	0142: K86	6,18,38
20	0143:K	12
21	0144:K	4,Н-*
22	0151:K-	10,11
23	«408»	10,12

\*Неподвижные штаммы (Н-) могут быть и в других серогруппах и являются самостоятельными сероварами.

\*\* Объединены обе разновидности – 0128аб: K67 и 0128ас: K67.

Приложение 25  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Антигенно-диагностическая схема возбудителей парентеральных эшерихиозов

О-группа	Н-антигены, определяющие серовары	О-группа	Н-антигены, определяющие серовары
01	4,5,7,8,10,33,45	016	7
02	1,4,5,49	0	18,32
04	1,4,5,18,20,27,42	018	7,14,19
05	4,8,10	020	4,9
06	1	021	2,4,7,12,25
07	4	022	1
08	1,2,3,4,5,8,9,10,16 19,20,21,25,26,28,30	025	4
		026	40
09	4,7,8,9,10,17,19	075	5,7,10,16,19
010	4,12,14	077	18,44
011	4,10,25	0101	4,9
015	4,9,10,18,21,27	-	-

Примечание. Среди возбудителей парентеральных эшерихиозов могут встречаться эшерихии и других О-групп и сероваров.

Приложение 26  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Серовары *Escherichia coli*, наиболее часто вызывающие поражения у человека

Поражения	Серогруппы		
	О-Ar	Н-Ar	К-Ar
Кишечные			
Энтеротоксигенные	O6, O8, O11, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O114, O115, O126, O128ac, O139, O148, O153, O159, O116, O167.	H4, H7, H9, H11, H12, H19, H20, H21, H28, H40	-
Энтеропатогенные	O18, O26, O44, O55, O86, O111ab, O112, O114, O119, O125ac, O127, O128ab, O142, O158	H2, H6, H7, H11, H12, H14, H18	-
Энтероинвазивные	O28ab, O29, O112ac, O115, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O146, O167.	-	-
Энтерогеморрагические	O26, O111, O157	H6, H7, H8, H11	-

Примечание. Условные обозначения: «-» - антиген отсутствует, либо не обнаружен.

Приложение 27  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Внутривидовая дифференциация рода *Citrobacter*

Тест или субстрат	<i>C. freundii</i>	<i>C. diversus</i>	<i>C. amalonaticus</i>
Сероводород	+	-	-
Индол	-	+	+
Малонат натрия	-	+	+
Орнитин	-,+	+	+
Адонит	-	+	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «-,+» - чаще отрицательная, реже положительная реакция.

Приложение 28  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Внутривидовая дифференциация рода *Klebsiella*

Тест или субстрат	<i>K. pneumoniae</i> подвид <i>pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> подвид <i>ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> подвид <i>rhinoscleromatis</i>	<i>K. ox-</i> <i>itoca</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. terrigena</i>
Индол	-	-	-	+	-	-
Метилрот	-	+	+	-	+	-/+
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	-	-	+	+	+
Цитрат Симонса	+	+/-	-	+	+	+/-
Мочевина	+	-	-	+	+	-
Лизин	+	+/-	-	+	+	+
Малонат	+	-	+	+	+	+

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «+/-» - или «-/+» - разные биовары.

Приложение 29  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Внутривидовая дифференциация рода *Enterobacter*

Тест или субстрат	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. sacazaki</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>E. agglomerans</i> переведен в <i>Pantoea</i>
Мочевина	(+)	-	-	(+)	-/+
Лизин	-	+	-	+	-
Адонит	-/+	+	-	-	-/+
Инозит	-/+	+	+/-	-/+	-/+
Сорбит	+	+	-	-	+/-
Малонат натрия	+/-	+/-	-/+	+	+/-
Желтый пигмент	-	-	+	-	+/-

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» отрицательная реакция; «+/-» - или «-/+» - разные биовары; «(+))» - замедленная или слабо выраженная реакция.

Приложение 30  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Основные биохимические свойства *Hafnia alvei*

Тест или субстрат	Биохимические свойства при:	
	37 <sup>0</sup> C	22 <sup>0</sup> C
Реакция с метиловым красным	+	-
Реакция Фогеса-Проскауэра	x	+
Цитрат Симонса	(+),-	x
Глюкоза (газ)	x	+
Лактоза	-,(+)	-
Сероводород	-	-
Индол	-	-
Мочевина	-	-
Лизиндекарбоксилаза	+	+
Сорбит	-	-
Подвижность	x	+

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «-,(+))» - чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция; «(+),-» - чаще замедленно положительная, реже отрицательная реакция; «x» - различные результаты реакции.

Приложение 31  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Дифференциация биоваров вида *S. Marcescens*

Тест или субстрат	Биовары		
	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. rubiuaea</i>
Глюкоза (газ)-слабое газообразование	x	+	x
Лактоза	-	x	+
Арабиноза	-	+	+
Сорбит	+	+	-
Цитрат Симонса	+	+	+, -
Малонат натрия	-	-	x
Лизиндекарбоксилаза	+	x	x
Орнитиндекарбоксилаза	+	x	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «+, -» - чаще положительная, реже отрицательная реакция; «x» - различные результаты реакции.

Приложение 32  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Внутривидовая дифференциация рода *Proteus*

Тест или субстрат	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mxyofaciens</i>	<i>P. pennori</i>
Индол	-	+	-	-
Реакция Фогеса-Проскауэра	-, +	-	+	-
Цитрат Симонса	-, +	-	+	-
Сероводород	-	+	-	+, -
Орнитин	+	-	-	-
Мальтоза	-	+	+	+
Ксилоза	+	+	-	+

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «-, +» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «+, -» - чаще положительная, реже отрицательная реакция.

Приложение 33  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Основные биохимические свойства *Edwardsiella tarda*

Тест или субстрат	Биохимические свойства
Индол	+
Сероводород	+
Маннит	-
Лактоза	-
Глюкоза (газ)	+
Лизиндекарбоксилаза	+
Подвижность	+
Мочевина	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция.

Приложение 34  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Внутривидовая дифференциация рода *Yersinia*  
(без вида *Y. pestis*)

Тест или субстрат	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Глюкоза	-	-,+
Сахароза	-	+
Мочевина	+	+,(+)
Сероводород	-	-
Индол	-	+
Ацетат натрия	-	x
Сорбит	-	+
Реакция Фогеса-Проскауэра (при 22-25 <sup>0</sup> C)	-	+
Подвижность	- (37 <sup>0</sup> C) +(22 <sup>0</sup> C)	- (37 <sup>0</sup> C) +(22 <sup>0</sup> C)
Целлобиоза	-	+
Рамноза	+	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «-,+» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «+,(+)» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «x» - различные результаты реакции.



Приложение 35  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биохимические свойства *E. herbicola*

Тест или субстрат	Биохимические свойства
Глюкоза (газ)	-
Лактоза	x
Сахароза	+
Мочевина	-
Индол	-
Сероводород	-,+
Цитрат Симонса	+
Маннит	+
Инозит	x
Адонит	-
Сорбит	x
Реакция с метиловым красным	-
Реакция Фогеса-Проскауэра	x
Фенилаланиндезаминаза	x
Желатин	+
Малонат натрия	x

Примечание. Условные обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «-,+» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «x» - различные результаты реакции.

Приложение 36  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Антигенно–диагностическая схема представителей рода *Citrobacter*

О– группа	О– антигенный комплекс	Н- антиген
1	2	3
01	1а, 1в, 1с, 1	1,2; 14,15, 16; 21,25,26; 21, 25, 27; 39.
02	2в, 1в	1,2,4,5,6; 7,8,10; 8,10,11; 14,15,16; 13,17; 21, 22; 23,28; 32,34; 35,37; 39.
03	3а, 3в, 10	4, 5; 5,6; 7,8,10; 8; 8,9; 9,13,14; 14,15,16; 13,17; 21,22; 21,23; 21,24; 21,25; 27,9,29,30; 9,29, 31; 32,33; 39;47; 90.
04	4а, 4в	4,5; 5,6; 7,8,10; 9,13,14; 13,18,19; 19,20; 9,29,30; 9,29,31; 32,34; 44,45; 44, 46; 95.
05	5а, 5в, 4а	58, 54; 68,78.
06	6,4в, 5в	72; 54.
07	7, 3а,1с	4,5; 7,8,10; 8,9; 9,13,14; 21,22; 21,23; 21,25,27; 32,33,39; 68.
08	8а,1	1,2; 5,6; 8,12; 9,13,14; 9,13,15; 21,22; 21,25,27; 9,29,30; 32,33;39,53,55; 67.
	8а,8в	1,2; 8,12; 9,13,14; 21,25,26; 21,25,27; 35; 37.
	8а,8с	5,6; 9,13,14; 13,17; 21,25,27; 32,33; 35,37; 76.
09	9а,9в	1,2; 2,3; 4,5; 8,9; 13,17; 21,25, 26; 32,33; 32,34; 39,48.
010	10,9в	13,17; 9,29; 30; 48.
011	11	9,18,14; 14,15,16; 32,33; 35,37; 35,36; 38; 77,78; 83.
012	12а, 12в	5,6; 13,17; 35,36; 57; 9,29,31;
	12а, 12с	62,57.
013	13	5,6; 59; 65; 66; 69.
014	14	40,41; 61.
015	15	13,18,19; 21,22; 32,34.
016	16	21,24; 58
017	17	21,24; 44,45; 75
018	18	56
019	19	14,15,16; 87; 74
020	20	40,41,3
021	21в, 21в	60; 9,29,31; 40,41; 44,45; 53,54; 21,24
022	22	64
023	23	52;41,97
024	24	49,51; 85
025	25	85,36,38
026	26	49,50; 59
027	27	40,41
028	28, 1с	70

1	2	3
029	29	8,10,11; 40,42; 74; 75; 77,78; 77,79; 77,80; 77,88; 82; 83; 84; 85; 96; 87.
030	30,21B	76; 35,37; 39
031	31	71
032	32	23,28
033	33	87
034	34	68
035	35	91
036	36	35,36; 54,78
037	37	1,5
038	38	92
039	39	61; 94
040	40	76
041	41	98
042	42	68; 98

Приложение 37  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Сокращённая антигенно-диагностическая схема *P.vulgaris* и  
*P.mirabilis*

О-антиген (О-группа)	Н-антиген	О-антиген (О-группа)	Н-антиген
1	1	26	2; 3; 6
2	1	27	2; 2
3	1; 2	28	1;3
4	1; 8; 16	29	13
5	1; 3	30	1;2;4;13;15
6	1;2;3	31	1;2
7	1;3;4	32	1;3;5
8	1	33	3
9	1;2	34	6
10	1;2;3;4;5	35	2
11	1;2;3;6	36	3;7
12	1;2	37	17
13	1;2;3;4	38	1;2
14	1;3	39	16
15	1;7	40	4
16	1;9;14	41	1;2
17	1;10	42	1
18	1	43	2
19	1;3;11	44	11;19
20	1;2	45	11
21	1	46	17
22	1	47	1
23	1;2;3;12	48	1
24	1;3;4;13	49	2
25	1		

Приложение 38  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Антигенная структура иерсиний

Вид иерсиний	Серогруппы				Биовар
	Регистрируемые при заболевании человека				
	постоянно	редко	в единичных случаях	не регистрируемые	
<i>Y. enterocolitica</i>	08	06.30	010,013.7, 014	04.32; 06.31; 07.8; 015; 018; 19.8; 020; 021; 022	1
	09	-	-	-	2
	05.27	-	-	05	3
	03	-	-	-	4
	-	-	-	-	5
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	I	III	IV,II	V,VI	нет

Приложение 39  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары *S. flexneri* 6 (*S. newcastle*)

Биовар	Ферментация углеводов		
	глюкоза	маннит	дульцит
Boydii 88	+	+	-
	+	+	(+)
Manchester	++	++	(++)
	++	++	-
	++	-	(++)
Newcastle	+	-	-
	+	-	(+)

Примечание. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «-» - отсутствие ферментации; «++» - ферментация с образованием кислоты и газа; «(+))» - замедленная ферментация; «(++)» - замедленная ферментация с образованием кислоты и газа.

Приложение 40  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары *S.flexneri* 1-5, X и Y variant

Биовар	Ферментация углеводов			
	мальтоза	арабиноза	сорбит	рамноза
1	+,(+)	+,(+)	+,(+)	+,(+)
2	+,(+)	+,(+)	+,(+)	-
3	+,(+)	-	+,(+)	+,(+)
4	+,(+)	-	-	-
5	+,(+)	-	+,(+)	-
6	+,(+)	+,(+)	-	-
7	+,(+)	+,(+)	-	+
8	-	+,(+)	+,(+)	+,(+)
9	-	-	+,(+)	+,(+)
10	-	+,(+)	+,(+)	-
11	-	-	+,(+)	-
12	-	+,(+)	-	-
13	-	+	-	(+)
14	-	-	-	(+)
15	-	-	-	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «+,(+)» - ферментация с образованием кислоты и газа; «-» - отсутствие ферментации; «(+))» - замедленная ферментация.

Приложение 41  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары *S.boydii*

Биовар	Ферментация углеводов			
	сорбит	глицерин	ксилоза	дульцит
1	+	+	+	+
2	+	+	-	+
3	+	+	+	-
4	-	+	-	-
5	+	+	-	-
6	-	+	-	+
7	+	-	-	+
8	-	+	+	+

Примечание. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «-» - отсутствие ферментации.

Приложение 42  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары *S.typhimurium*

Биовар	арабиноза	ксилоза	рамноза	D-гартрат	L-гартрат	мукат	инозит
1	+	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+	+
9	+	+	-	+	+	+	+
10	+	+	-	+	+	-	+
11	-	+	-	-	-	+	+
12	+	+	-	+	+	+	-
13	-	-	-	+	+	+	+
14	-	-	+	+	+	+	+
15	+	-	+	+	+	+	-
16	+	-	+	-	-	+	+
17	+	+	+	-	-	+	-
18	+	+	+	-	-	+	+
19	+	+	+	-	-	-	+
20	+	+	+	-	-	-	-
21	+	+	+	+	-	+	+
22	+	+	+	-	+	+	-
23	+	+	+	-	+	+	-
24	+	+	+	+	-	+	-
25	+	+	+	+	+	-	+

Примечание. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «-» - отсутствие ферментации.

Приложение 43  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары E.coli 0151:K-

Серовар	Глюкоза	Дульцит	Сорбит	Арабиноза	Лизиндекар-боксилаза	Биовар
0151:K- H10	++	+	+1-2	+	+	+
0151:K- H10	+	+	+1-2	-	+	2
0151:K- H10	+	+	-	-	-	3
0151:K- H10	+	+	+1-2	+	+	4
0151:K- H10	+	-	(+)	+	(+) 2-3	5
0151:K- H10						
0151:K- H11						

Примечание. Цифры указывают сутки появления положительной реакции. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «-» - отсутствие ферментации; «++» - ферментация с образованием кислоты и газа; «(+))» - замедленная ферментация.

Приложение 44  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары E.coli 0144:K

Серовар	Глюкоза	Лактоза	Дульцит	Сорбит	Салицин	Лизин-декар-боксилаза	Биовар
0144:K:H-	+	(+)	-	-	-	-	1
0144:K:H4	++	+	-	+,(+)	(+)	+	2
0144:K:H18	++	-	(+)	(+)	-,(+)	-	3
0144:K:H23							

Примечание. Цифры указывают сутки появления положительной реакции. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «-» - отсутствие ферментации; «++» - ферментация с образованием кислоты и газа; «(+))» - замедленная ферментация; «-,(+))» - чаще отрицательная ферментация, реже замедленно положительная ферментация; «+,(+))» - ферментация с образованием кислоты и газа.



Приложение 45  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары *E.coli* 0124:K72

Серовар	Глюкоза	Лактоза	Дульцит	Рамноза	Салицин	Биовар
0124:K72:H- 0124:K72:H30	++	+	-	(+)	-	1
0124:K72:H30	++	(+)	(+)	-	-	2
0124:K72:H2 0124:K72:H12	++	+	(+)	+	+	3

Примечание. Цифры указывают сутки появления положительной реакции. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «-» - отсутствие ферментации; «++» - ферментация с образованием кислоты и газа; «(+))» - замедленная ферментация.

Приложение 46  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары *K. pneumoniae*

Тест-субстрат	Биовары							
	a	b	c	D	Da	Db	Dc	Dd
Дульцит	-	-	-	-	+	+	+	+
Сорбоза	-	-	+	+	-	-	+	+
D-тартрат	+	-	+	-	+	-	+	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «-» - отсутствие ферментации.

Приложение 47  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Биовары *Y. enterocolitica*

Биовары	Тест или субстрат			
	трегалоза	Д-ксилоза	индол	салицин
1	+	+	+	+
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	-	-	-
5	-	-	-	-

Примечание. Условные обозначения: «+» - ферментация с образованием кислоты; «-» - отсутствие ферментации.

Приложение 48  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

Схема определения фаговаров *S. paratyphi A*

Типовые фаги Фаговары	1	2	3	4	5	6
1	CL	CL	CL	CL	CL	CL
2	-	CL	-	-	-	CL
3	-	-	CL	-	-	-
4	++	++	-	CL	+++	-
5	-	-	-	-	CL	-
6	-	-	-	-	-	CL

Примечание. Условные обозначения: «CL» - сливной лизис; «+++» - отдельные негативные колонии (более 10); «++» - отдельные негативные колонии (менее 10); «-» - отсутствие лизиса.

Приложение 49  
к Инструкции по применению  
«Микробиологическая диагностика забо-  
леваний, вызываемых энтеробактериями»

Эталонные колициногенные штаммы для определения  
колициноваров шигелл (P.Fredericg)

Наименование штамма	Продуцируемый колицин
E.coli CA-18	B
E.coli CA-27	D
E.coli CA-38	E+I
E.coli CA-42	F
E.coli CA-53	I
E.coli CA-235	K
E.coli CA-62	J+I
E.coli CA7	V
S.boydii F-1	S <sub>1</sub>
S.boydii F-9	S <sub>3</sub> +I
S.boydii F-14	S <sub>5</sub>

## ОГЛАВЛЕНИЕ

## Инструкция по применению

«Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»

	стр
Глава 1 Область применения .....	2
Глава 2 Классификация и номенклатура энтеробактерий .....	2
Глава 3 Отбор, транспортировка, хранение материала для исследования.....	2
Глава 4 Посев материала и выделение чистой культуры .....	5
Глава 5 Идентификация энтеробактерий .....	9
Глава 6 Первичная идентификация .....	9
Глава 7 Дифференциация родов .....	11
Глава 8 Идентификация видов и внутривидовая дифференциация .....	14
Глава 9 Идентификация видов рода <i>Shigella</i> .....	14
Глава 10 Идентификация видов рода <i>Salmonella</i> .....	15
Глава 11 Внутривидовая идентификация рода <i>Escherichia</i> .....	17
Глава 12 Идентификация видов родов <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Erwinia</i> .....	20
Глава 13 Ускоренная идентификация и выявление антигенов энтеробактерий. Системы индикаторные бумажные .....	22
Глава 14 Метод иммунофлуоресценции .....	24
Глава 15 Формулировка ответов, сроки выдачи.....	25
Глава 16 Питательные среды и реактивы .....	26
Глава 17 Среды для первичных посевов материала и высевов со сред обогащения .....	30
Глава 18 Среды для биохимической дифференциации .....	31
Глава 19 Среды и реактивы для дифференциации энтеробактерий от представителей других семейств .....	36
Глава 20 Определение эпидемических маркеров штаммов энтеробактерий ....	39
Глава 21 Определение сероваров у некоторых условно-патогенных энтеробактерий .....	39
Глава 22 Определение биоваров .....	41
Глава 23 Фаготипирование .....	43
Глава 24 Типирование шигелл по колициногенной активности.....	45
Глава 25 Типирование шигелл по чувствительности к колицинам .....	46
Глава 26 Метод определения чувствительности штаммов энтеробактерий к антибиотикам.....	47
Глава 27 Серологическая диагностика заболеваний и бактерионосительства ...	48
Глава 28 Реакция прямой гемагглютинации в диагностике брюшного тифа, паратифов, других сальмонеллезов и дизентерии.....	49
Глава 29 Реакция агглютинации с бактериальными диагностикумами при диагностике брюшного тифа, паратифов, других сальмонеллезов и ди- зентерии .....	52
Глава 30 Реакция агглютинации с аутоштаммами в диагностике заболеваний, вызываемых условно патогенными энтеробактериями .	53

Приложение 1	Классификация семейства Enterobacteriaceae .....	54
Приложение 2	Схема микробиологического исследования на энтеробактерии	56
Приложение 3	Показания к микробиологическим исследованиям различного клинического материала .....	57
Приложение 4	Питательные среды для первичного посева в соответствии с ис- следуемым материалом .....	59
Приложение 5	Характеристика колоний энтеробактерий различных родов .....	62
Приложение 6	Первичная идентификация энтеробактерий по биохимическим реакциям в комбинированной среде и выбор тестов для установ- ления родовой принадлежности .....	64
Приложение 7	Дифференциация энтеробактерий от некоторых других грамотрицательных микроорганизмов .....	66
Приложение 8	Дифференциация родовых групп Enterobacteriaceae по биохими- ческим свойствам при использовании минимального дифференцирующего ряда ... ..	67
Приложение 9	Расширенная характеристика биохимических свойств родовых групп Enterobacteriaceae .....	68
Приложение 10	Результаты основных биохимических реакций на комбиниро- ванных средах в минимальном дифференцирующем ряду .....	70
Приложение 11	Классификация бактерий рода Shigella .....	72
Приложение 12	Дифференциация видов Shigella по биохимическим свойствам .....	73
Приложение 13	Биохимические свойства сероваров S.disenteriae .....	74
Приложение 14	Биохимические свойства сероваров S.flexneri .....	74
Приложение 15	Биохимические свойства сероваров S.boydii .....	75
Приложение 16	Схема определения биоваров S.sonnei .....	76
Приложение 17	Дифференциация подродов Salmonella по биохимическим свой- ствам .....	76
Приложение 18	Сокращенная схема Кауфмана-Уайта .....	77
Приложение 19	Дифференциация подродов Salmonella с однотипной антигенной структурой по биохимическим свойствам .....	80
Приложение 20	Внутривидовая идентификация рода Escherichia .....	80
Приложение 21	Основные биохимические свойства бактерий вида E.coli.....	81
Приложение 22	Состав поливалентных ОК–сывороток для серологической идентификации энтеропатогенных эшерихий .....	82
Приложение 23	Препараты для окончательной серологической идентификации энтеропатогенных эшерихий в реакции агглютинации на стекле .....	82
Приложение 24	Антигенно-диагностическая схема известных разновидностей энтеропатогенных эшерихий .....	83
Приложение 25	Антигенно-диагностическая схема возбудителей парентераль- ных эшерихиозов .....	84
Приложение 26	Серовары Escherichia coli, наиболее часто вызывающие поражения у человека .....	84
Приложение 27	Внутривидовая дифференциация рода Citrobacter .....	85

Приложение 28	Внутривидовая дифференциация рода <i>Klebsiella</i> .....	85
Приложение 29	Внутривидовая дифференциация рода <i>Enterobacter</i> .....	86
Приложение 30	Основные биохимические свойства <i>Hafnia alvei</i> .....	86
Приложение 31	Дифференциация биоваров вида <i>S. marcescens</i> .....	87
Приложение 32	Внутривидовая дифференциация рода <i>Proteus</i> .....	87
Приложение 33	Основные биохимические свойства <i>Edwardsiella tarda</i> .....	88
Приложение 34	Дифференциация видов рода <i>Yersinia</i> .....	88
Приложение 35	Биохимические свойства <i>E. Herbicola</i> .....	89
Приложение 36	Антигенно–диагностическая схема представителей рода <i>Citrobacter</i> .....	90
Приложение 37	Сокращённая антигенно-диагностическая схема <i>P.vulgaris</i> и <i>P.mirabilis</i> .....	92
Приложение 38	Антигенная структура иерсиний.....	93
Приложение 39	Биовары <i>S.flexneri</i> 6 ( <i>S.newcastle</i> ) .....	93
Приложение 40	Биовары <i>S.flexneri</i> 1-5, X и Y variant .....	94
Приложение 41	Биовары <i>S.boydii</i> .....	94
Приложение 42	Биовары <i>S.typhimurium</i> .....	95
Приложение 43	Биовары <i>E.coli</i> 0151:K.....	96
Приложение 44	Биовары <i>E.coli</i> 0144:K.....	96
Приложение 45	Биовары <i>E.coli</i> 0124:K72 .....	97
Приложение 46	Биовары <i>K. Pneumoniae</i> .....	97
Приложение 47	Биовары <i>Y.enterocolitica</i> .....	98
Приложение 48	Схема определения фаговаров <i>S. paratyphi</i> A .....	98
Приложение 49	Эталонные колициногенные штаммы для определения колициноваров шигелл ( <i>P.Fredericg</i> ) .....	99

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция по применению «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями» подготовлена ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (В.А.Нараленков, П.В.Шитикова, Е.М.Науменко, А.Б.Можейко); ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» (Л.П.Титов, Т.С.Ермакова, Л.Д.Газиумарова, Е.Ф.Паньшина).

2. Утверждена заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 8 мая 2009г. №026-0309.

3. Введена взамен «Методических указаний по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями» № 04-23/3, утвержденных заместителем Министра здравоохранения СССР 17 декабря 1984 г.