



РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
Міністэрства аховы здароўя
ГАЛОЎНЫ ДЗЯРЖАЎНЫ
САНИТАРНЫ ЎРАЧ
РЕСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

220048, г. Мінск, вул. Мяснікова, 39
факс 200-64-59 E-mail:mrimzha@belcmt.by

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
Министерство здравоохранения
ГЛАВНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
САНИТАРНЫЙ ВРАЧ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Телефон 222-69-97

220048, г. Минск, ул. Мясникова, 39
факс 200-64-59 E-mail:mrimzha@belcmt.by

«9» октября 2006 г. № _____

На № _____

ПОСТАНОВЛЕНИЕ № 120

Об утверждении Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы
выделения и идентификации
возбудителей при бактериальных
пищевых отравлениях»

В целях исполнения Закона Республики Беларусь от 23 ноября 1993г. «О санитарно-эпидемическом благополучии населения» в редакции от 23 мая 2000 года (Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь, 2000г., №52, 2/172) постановляю:

1. Утвердить прилагаемую Инструкцию 4.2.10-15-21-2006 «Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях» и ввести ее в действие на территории Республики Беларусь с 1 декабря 2006г.

2. С момента введения в действие Инструкции 4.2.10-15-21-2006 «Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях» не применять на территории Республики Беларусь «Инструкцию о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях» № 1135-73, утвержденную Главным государственным санитарным врачом СССР 20 декабря 1973 г.

3. Главным государственным санитарным врачам областей и г. Минска довести данное постановление до сведения всех заинтересованных и установить контроль за его выполнением.

 М.И. Римжа

УТВЕРЖДЕНО
Постановление
Главного государственного
санитарного врача
Республики Беларусь
9 октября 2006 № 120

Инструкция 4.2.10-15-21-2006
«МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И
ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ
ОТРАВЛЕНИЯХ»

ГЛАВА 1
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция устанавливает микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях и предназначена для специалистов органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, организаций здравоохранения и других республиканских органов государственного управления.

2. Настоящая Инструкция является обязательной к применению в ходе проведения микробиологических исследований по реализации санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий при пищевых отравлениях.

3. Перечень объектов, которые по предварительным данным санитарно-эпидемиологического расследования связаны с предполагаемой этиологией отравления, сроки забора материала, объем микробиологических исследований, определяются лечащим врачом или врачом-эпидемиологом.

4. Пищевые отравления, вызванные микроорганизмами, представляют актуальную проблему здравоохранения. Большинство стран отмечают существенные увеличения на протяжении последних десятилетий значительной распространенности заболеваний, связанных с содержанием микроорганизмов в пищевых продуктах.

5. К числу этих микроорганизмов относятся сальмонеллы, кампилобактерии, энтеропатогенные кишечные палочки. Своей актуальности не теряют и другие возбудители: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Basillus cereus*, бактерии рода *Shigella* и др. Различные виды патогенных и условно-патогенных микроорганизмов могут явиться причиной пищевого отравления при определенных условиях и массивности дозы.

ГЛАВА 2
ОТБОР, НАПРАВЛЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ПРОБ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

6. На исследование направляются те материалы, которые по предварительным данным санитарно-эпидемиологического расследования связаны с предполагаемой этиологией отравления.

7. Объектами исследования могут быть: остатки подозреваемой пищи, употребленной заболевшими, а также исходные продукты и полуфабрикаты, которые использовались при ее приготовлении; суточные пробы готовой пищи (если установлен порядок обязательного их хранения); испражнения, рвотные массы, промывные воды, моча пострадавших; кровь для получения гемокультур и для постановки серологических реакций (при подозрении на ботулизм кровь берут до введения лечебной противоботулинической сыворотки); слизь из зева и носа, выделения гнойничковых поражений кожи персонала, занятого приготовлением готовой пищи; смывы и соскобы с инвентаря, оборудования, тары, рук персонала; вода питьевая, в том числе из графинов, питьевых бачков; содержимое желудка, отрезок тонкого кишечника, паренхиматозные органы (печень, селезенка), кровь из сердца, костный мозг, мезентериальные лимфатические узлы, желчь – при летальных исходах заболевания.

8. Общим требованием к процедуре отбора проб является обеспечение условий, исключающих контаминацию посторонней микрофлорой.

9. Клинический материал, подлежащий бактериологическому исследованию, собирают в стерильную посуду, которую хорошо укупоривают, снабжают этикеткой с фамилией обследуемого и наименованием материала, пробы нумеруют и печатают. В сопроводительном документе (направлении) указывают какое учреждение направляет материал; фамилию, имя, отчество и возраст обследуемого; адрес; место работы, учебы, пребывания в организованном коллективе, закрытом учреждении и др.; дату и время заболевания; предполагаемый диагноз; дату и время взятия пробы; фамилию и должность лица, направляющего материал.

10. Пересылку проб в микробиологическую лабораторию производят в кратчайший срок, если взятые на бактериологическое исследование пробы не могут быть доставлены в лабораторию немедленно, их разрешается хранить в холодильнике при температуре 4-6⁰С не более суток.

11. Испражнения, получают при естественной дефекации или с помощью ректальных тампонов (петель).

11.1. Для сбора материала путем естественной дефекации используют тщательно вымытые и лишенные следов дезинфицирующих средств судна или горшки. На дно судна, для защиты материала от следов дезинфектанта, можно поместить лист чистой бумаги. Пробу испражнений отбирают сразу после дефекации с помощью стерильной стеклянной палочки, проволочной петли или деревянного шпателя. При наличии патологических примесей необходимо выбрать участки, содержащие слизь, гной, хлопья, но свободные от крови.

11.2. Получение материала из прямой кишки с помощью ректальных тампонов (петель) осуществляется средним медицинским персоналом. Больного просят лечь на бок с притянутыми к животу бедрами и ладонями развести ягодицы. Петля (тампон) вводится в задний проход на глубину 5-6 см.

11.3. Для забора материала используют петли из алюминиевой проволоки (отрезок проволоки длиной около 50 см сгибается пополам) или ватные (ватно-марлевые) тампоны, укрепленные на металлической петле или деревянной палочке. Ряд фирм выпускает специальные устройства для этих целей.

11.4. Если планируется проведение исследований на острые кишечные инфекции (далее - ОКИ), обусловленные условно-патогенными бактериями, то материал может быть получен только путем естественной дефекации. Получение материала путем естественной дефекации является также предпочтительным при проведении исследований на кампилобактеры и энтеропатогенные кишечные палочки. Перед обследованием взрослых на бактерионосительство рекомендуется предварительное назначение слабительного.

11.5. Материал собирают в пустую стерильную посуду или в пробирки с консервантом. При исследовании на ОКИ, обусловленные условно-патогенными микроорганизмами, консервант не используется. Время до начала бактериологического исследования, если консервант не применяется, не должно превышать 2 часов.

11.6. В качестве консервантов (транспортных сред) используют глицериновую смесь, фосфатно-буферную смесь, а при исследовании на кампилобактериоз – физиологический раствор, 0,1% пептонную воду, тиогликолевую среду. При исследовании на наличие иерсиний глицериновый консервант непригоден. Наиболее универсальным консервантом является транспортная среда Кэри-Блер.

11.7. Применение транспортных сред обязательно, если материал забирается с помощью ректального тампона (петли). Важно отметить, что попадание транспортных сред на слизистую прямой кишки недопустимо! Поэтому ректальная петля должна упаковываться отдельно и погружаться в транспортную среду только после взятия материала.

11.8. Объем испражнений, вносимых в транспортную среду не должен превышать 1/3 её объема. После внесения пробу перемешивают со средой. Время хранения образцов до начала исследования может составлять до 1 суток в холодильнике, однако оптимальным является проведение посева через 1-2 часа после забора.

12. Взятие крови целесообразно осуществлять во время лихорадочного периода, до начала химиотерапии или через 12-24 часа после последнего введения препарата. Манипуляции проводят с соблюдением правил асептики.

12.1. Кровь для бактериологического исследования у взрослых забирается в количестве не менее 10 мл, у детей – не менее 5 мл, у новорожденных – 1-2 мл. Кровь берут у постели больного или в перевязочной и тут же засевают на питательные среды в соотношении 1:10 во флаконы со средой.

12.2. Кровь для постановки серологических реакций забирают из локтевой вены в стерильную сухую пробирку в количестве не менее 8-10 мл. Постановку серологических реакций производят с сывороткой крови. С целью формирования сгустка кровь выдерживают 30-40 минут при комнатной температуре или в термостате при $37+1^{\circ}\text{C}$, после чего стерильной пипеткой отделяют сгусток от стенок пробирки и помещают в холодильник при температуре $5-8^{\circ}\text{C}$ для окончательного формирования сгустка, сыворотку отсасывают и используют для постановки серологических реакций.

13. Рвотные массы отбирают в количестве 50-100 мл, промывные воды – в количестве 100-200 мл. При кислой реакции рвотные массы перед посевом нейтрализуют 10% стерильным раствором натрия гидрокарбоната (NaHCO_3).

14. Желчь (дуоденальное содержимое) получают путем зондирования, реже, во время операции при пункции желчного пузыря. При зондировании желчь собирают в 3 стерильные пробирки отдельно по порциям А, В, С. Пробы должны быть доставлены в лабораторию в течение 1-2 часов.

15. Среднюю порцию свободно выпущенной мочи в количестве 20-30 мл собирают в стерильную посуду. Перед взятием материала больной должен совершить тщательный туалет наружных половых органов. Пробы мочи могут храниться до начала исследования не более 1-2 часов при комнатной температуре и не более суток в холодильнике. Мочу перед посевом центрифугируют и засевают осадок, или используют для посева нативную мочу.

16. Гной, пунктаты органов, экссудат берут с помощью стерильного шприца или тампона и помещают в стерильные пробирки.

17. Спинномозговую жидкость получают при люмбальной пункции, в количестве 5-10 мл и помещают в стерильную пробирку.

18. Слизь из зева и носа забирают стерильным ватным тампоном и непосредственно засевают на питательные среды или помещают в стерильную пробирку.

19. Секционный материал забирают из каждого органа или ткани, в стерильных условиях: поверхность органа прижигают раскаленным шпателем, кусочки вырезают из глубины стерильными ножницами. Из желудка и кишечника содержимое забирают пастеровской пипеткой путем прокола их стенки. Место прокола предварительно прижигают раскаленным шпателем. Пробы от каждого органа помещают в отдельные стерильные банки.

20. Отбор проб пищевых продуктов проводят в соответствии с ГОСТ 26668-85 «Продукты пищевые и вкусовые методы отбора проб для микробиологических анализов», и другими нормативными документами на конкретный вид продукции.

20.1. Масса (объем) пробы устанавливается в соответствии с нормативным документом. В тех случаях, когда это невыполнимо, отбор проб производят в количествах менее установленных. Пробы отбирают асептическим способом в стерильную посуду. Продукты заводского изготовления отбирают в оригинальной упаковке.

20.2. Отбор проб продуктов плотной консистенции и сыпучих можно выполнять путем затаривания в несколько слоев стерильной пергаментной бумаги. Остатки консервов направляют на исследование непосредственно в той емкости, из которой они использовались в пищу. При отсутствии остатков консервов, исследованию подлежит содержимое нескольких не вскрытых банок, с маркировкой, полностью идентичной маркировке вскрытой банки. Если в партии консервов одноименной маркировки имеются бомбажные банки, их отбирают и исследуют в первую очередь. Маркировочные знаки, поставленные на доньшке и крышке банок, регистрируют в лабораторном журнале.

20.3. Мясо отбирают для анализа в количестве 500 г, при этом проба отбирается из различных мест туши с обязательным взятием мезентериальных лимфатических узлов, а также участков трубчатой кости. Если возможно, то следует от животных отбирать кровь из сердца, содержимое кишечника, желчь и стенки

желчного пузыря. Для исследования могут быть использованы также смывы с поверхности туши.

20.4. Птицу берут целой тушкой или ее остатки, включая анальное отверстие.

20.5. Мелкую рыбу отбирают в количестве 2-3 штук, от крупной рыбы – 2-3 куска, в том числе из спинки, ближе к голове и из участков вблизи анального отверстия.

20.6. Продукты, находящиеся в бочечной таре, берут сверху, из середины и со дна бочки. В отдельную посуду набирают 100-200 мл рассола.

20.7. Пробы жидких и полужидких объектов (супы, соусы, кремы, салаты, молочные продукты) отбирают после тщательного перемешивания в количестве около 200 г. Для вторых блюд норма выемки 1-2 порции. Остатки фактически употребленной пищи отбирают для анализа непосредственно в тех емкостях, в которых они были обнаружены. Допускается доставка также в стерильной посуде, куда остатки пищи должны быть перемещены с соблюдением правил асептики. Суточные пробы направляют для исследования непосредственно в той емкости, в которой они хранились в холодильнике.

20.8. В микробиологическую лабораторию пробы пищевых продуктов доставляют в опечатанном виде. В сопроводительном документе указывают: наименование предприятия или учреждения, где произведены выемки проб, его адрес; перечень проб с указанием их веса, характера тары и упаковки (стерильность посуды, охлаждение проб, наличие печати и т.д.); дату и время выемки и отправления в лабораторию; дату и время заболевания, срок появления первых клинических симптомов заболевания после употребления подозреваемой пищи, число пострадавших, госпитализированных, наличие случаев со смертельным исходом, предварительный диагноз; при направлении проб нескольких продуктов необходимо отметить, какой из них подозревается как фактор передачи пищевого отравления; цель исследования; должность и подпись лица, производшего выемку и направившего пробы в лабораторию.

20.9. Подготовку проб пищевых продуктов для микробиологических исследований проводят согласно ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

20.10. Исследование материалов, доставленных в микробиологическую лабораторию в процессе расследования пищевого отравления, производится немедленно по их получении. Во время регистрации доставленного в лабораторию материала, последний хранится в холодильнике.

20.11. Непосредственно перед посевом исполнителю необходимо ознакомиться с состоянием упаковки всего материала и каждой отдельной пробы, при этом обратить внимание на целостность упаковки, наличие пломб и печатей, отметить количество доставленного материала. В связи с тем, что большинство проб направляют в лабораторию для бактериологического и для химического исследования, указанный выше осмотр можно проводить совместно с химической лабораторией. Необходимо перед анализом отметить органолептические качества доставленных проб: внешний вид, запах, консистенцию.

20.12. Продукты подвергают бактериологическому исследованию независимо от признаков порчи. Бактериологические исследования пробы начинают с

подготовки навески, которая должна охарактеризовать всю доставленную пробу. Материал для навески продуктов плотной консистенции (мясо, колбаса и др.) отбирают из разных мест доставленной пробы: с поверхности и из глубины. Если это тушка птицы – из мест, прилегающих к кишечнику; если рыба – вблизи жаберных дужек и анального отверстия.

20.13. Возможно использование для приготовления навески всей доставленной пробы, если даже ее вес достигает 500-800 г. Имеет определенное значение исследование навески, состоящей из кусочков, отобранных только из глубины доставленной пробы. В этом случае при отборе материала для навески производят стерилизацию поверхности металлическим шпателем или ножом.

20.14. Возможно исследование навески продукта, состоящей из кусочков, отобранных только из поверхностных слоев пробы, т.к. это позволяет установить вторичное загрязнение продукта. В этом случае небольшие кусочки пищевых продуктов засевают непосредственно, при этом поверхность пробы не обжигают раскаленным шпателем или ножом, т.к. это может привести к уничтожению патогенной флоры. Навеска продукта должна быть не менее 25-30 г.

20.15. Стерильно взятую навеску продукта плотной консистенции перед посевом гомогенизируют с небольшим количеством 0,1% пептонной воды или питательной среды (в соотношении от 1:2 до 1:5, в зависимости от консистенции исследуемого продукта). Для получения однородного гомогенизированного посевного материала необходимо пользоваться гомогенизатором. При отсутствии гомогенизатора навеску продукта нарезают мелкими кусочками, помещают в стерильную банку, добавляют необходимое количество 0,1% пептонной воды и подвергают встряхиванию в течение 10-15 минут в аппарате для встряхивания.

20.16. Крем, масло сливочное, мороженое и т.п. перед посевом подвергают расплавлению. Для этого навеску в количестве 25-30 г отбирают в стерильную стеклянную банку и помещают либо в термостат при температуре 43⁰С, либо в водяную баню при той же температуре. После расплавления производят посев, причем при посевах масла и сливочного крема необходимо использовать нижний слой.

20.17. Костный мозг перед посевом извлекают из трубчатых костей и эмульгируют в подогретом до 43⁰С физиологическом растворе.

20.18. Жидкие пищевые продукты (молоко, напитки, супы) засевают без предварительной обработки.

20.19. Пищевые продукты, имеющие кислую реакцию, а также рвотные массы, перед посевом нейтрализуют 10% стерильным раствором натрия гидрокарбоната (NaHCO₃) до рН 7,2-7,4. Реакцию среды проверяют по универсальной индикаторной или лакмусовой бумажке.

20.20. Невскрытые консервы в банках перед посевом осматривают, отмечают внешний вид, наличие бомбажа, ржавчины и т.п., затем обмывают теплой водой с мылом и проверяют на герметичность по ГОСТ 30425-97 «Консервы, методы определения промышленной стерильности». Непосредственно перед посевом банки протирают спиртом, а крышки обжигают.

21. Отбор проб воды производят согласно: СТБ ГОСТ Р 51593-2001 «Вода питьевая. Отбор проб», МУК РБ 11-10-1-2002 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды». Выемку проб воды производят в количестве не менее 1

литра. При необходимости исследования воды из графинов, ее можно доставлять в лабораторию непосредственно в графинах. Пробы маркируют и сопровождают документом с указанием объема, места отбора, даты и времени отбора, фамилии специалиста отбравшего пробу.

22. Техника взятия смывов с объектов внешней среды описана в главе 15 настоящей Инструкции. При взятии смывов в направлении записывается номер образца по порядку, место взятия смыва, с какого объекта взят смыв (оборудование, инвентарь, посуда и др.). При взятии смывов с рук записывается: номер образца по порядку, фамилия, имя, отчество обследуемого, выполняемая работа (профессия и участок работы).

23. Соскобы с объектов внешней среды производят стерильным или прокаленным в пламени горелки ножом или скальпелем. Их собирают в стерильную банку или чашку Петри с небольшим количеством (2-3 мл) изотонического раствора хлорида натрия (далее – ИХН).

24. Необходимо отметить, что направление бактериологических исследований определяется клинической картиной заболевания и данными эпидемиологических расследований с учетом возможного выявления других, не приведенных в настоящей инструкции, возбудителей пищевых отравлений.

ГЛАВА 3 БАКТЕРИИ РОДА SALMONELLA

25. Термином «сальмонеллезы» обозначают большую группу инфекционных заболеваний человека и животных, возбудителями которых являются бактерии, относящиеся к семейству Enterobacteriaceae, роду Salmonella. Род представлен 2 видами: *S. enterica* и *S. bongori*. Вид *S. enterica* состоит из 6 подвигов (subspecies): *S. enterica* подвид *enterica*, *S. enterica* подвид *salamae*, *S. enterica* подвид *arizonae*, *S. enterica* подвид *diarizonae*, *S. enterica* подвид *houtenae* и *S. enterica* подвид *indica*. Виды и подвиды можно отличить на основе дифференциальных характеристик согласно приложению 1 к настоящей Инструкции.

26. Сальмонеллы – прямые грамтрицательные палочки (0,7-1,5x2-5 мкм), подвижны (перитрихи), факультативные анаэробы, хемоорганотрофы.

Сальмонеллы - оксидазонегативные, каталазопозитивные, индол и Фогес-Проскауэра негативные, метиловый красный и цитрат позитивные, продуцируют сероводород и не расщепляют мочевину. Биохимические свойства бактерий рода *Salmonella* согласно приложению 2 к настоящей Инструкции.

27. Основным резервуаром сальмонелл и источником инфекции являются животные (свиньи, крупный и мелкий рогатый скот и др.) и птицы (куры, гуси, утки и др.). Механизм заражения – фекально-оральный, ведущий путь передачи – пищевой: факторами передачи являются яйца птиц, мясо животных и птиц. Наибольшую опасность представляют продукты и блюда, которые после приготовления не подвергаются термической обработке, и особенно, если они длительно хранятся при комнатной температуре. Даже при интенсивном размножении сальмонелл в пищевых продуктах, они не изменяют ни вкуса, ни запаха, ни их внешнего вида.

28. Сальмонеллы долго сохраняют жизнеспособность во внешней среде: в воде открытых водоемов и питьевой воде они переживают от 11 до 120 дней, в

морской воде – от 15 до 27 дней, в почве – от 1 до 9 месяцев, в комнатной пыли – от 80 дней до 18 месяцев, в колбасных изделиях – от 60 до 130 дней, в замороженном мясе – от 6 до 13 месяцев, в яйцах – до 13 месяцев, в яичном порошке от 3 до 9 месяцев, в замороженных овощах и фруктах – 0,5-2,5 месяца. Границы температурного режима для роста сальмонелл находятся между +7⁰С и +45⁰С, оптимальной температурой для роста сальмонелл является +37⁰С. Они могут расти при значениях рН не ниже 4,1 и не выше 9,0, оптимальная рН для роста 6,5-7,5. Сальмонеллы чувствительны к воздействию высоких температур, при +57⁰С (в жидкой среде) большинство из них погибают в течение 1-3 мин, кипячение убивает мгновенно.

29. Сальмонеллы вида *S. enterica* обозначаются следующими символами: I – или название серовара для сероваров вида *S. enterica* подвида *enterica*. Для представителей других подвидов вида *S. enterica* введены следующие обозначения: II – для сероваров *S. enterica* subsp. *Salamae*; IIIa – для сероваров *S. enterica* subsp. *Arizonae*; IIIb – для сероваров *S. enterica* subsp. *Diarizonae*; IV – для сероваров *S. enterica* subsp. *Houtenae*; VI – для сероваров *S. enterica* subsp. *Indica*; V – Вид *S. bongori* – для 21 серовара *S. bongori* subsp. *bongori*. Деление на подвиды имеет определенное эпидемиологическое значение, так как основным естественным резервуаром сальмонелл подвида I служат теплокровные животные, для представителей остальных подвидов (II, IIIa, IIIb, IV, VI) и вида *S. bongori* (V) – холоднокровные животные и окружающая среда. Число сероваров сальмонелл, входящих в каждый подвид: *S. enterica* subsp. *Enterica* 1478 (59,1%), *S. enterica* subsp. *Salamae* 498 (19,9%), *S. enterica* subsp. *Arizonae* 94 (3,8%), *S. enterica* subsp. *Diarizonae* 327 (13,1%), *S. enterica* subsp. *Houtenae* 71 (2,8%), *S. enterica* subsp. *Indica* 12 (0,5%), *S. bongori* subsp. *Bongori* 21 (0,8%).

Определение и название подвидов не является обязательными в клинической микробиологической практике. Необходимым для идентификации является только название серовара подвида *Enterica*.

Серовары других подвидов вида *S. enterica* и вида *S. bongori* обозначаются № подвида и их антигенной формулой II – O 1,6,14 H z₁₀, e, n, x, z₁₅. Это значит, что штамм с такой антигенной характеристикой относится к виду *Enterica* subsp. *Salamae*. Подвиды включают около 2500 сероваров (серотипов) сальмонелл. Сокращенное название сероваров пишется с заглавной буквы, например: *S. typhi* (вместо “*Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar *Typhi*”).

30. Антигенная структура сальмонелл:

термостабильные O-антигены, сохраняющиеся при кипячении культуры в течение 2-5 часов, расположены на поверхности тела клетки, представляют собой липополисахаридно-пептидные комплексы. Серовары сальмонелл, имеющие общий компонент O-антигена, объединены в одну группу. Таких групп по Кауфману-Уайту насчитывается около 70;

термолабильные H-антигены, жгутиковые, имеют белковую природу, разрушаются нагреванием при температуре 75-100⁰С. Состав H-антигенов обуславливает деление сальмонелл на серовары. Выделяют антигены I (специфические) фазы и II (не специфические) фазы. Сальмонеллы, в которых H-антигены представлены двумя фазами называют двухфазными (в отличие от монофазных, имеющих антигенные факторы только I фазы);

одним из компонентов О-антигена является Vi-антиген. Vi-антиген – соматический антиген, принадлежащий к группе К-антигенов. Исследователи, впервые открывшие его у *S.typhi* назвали его «антиген вирулентности», считая что этот антиген обуславливает вирулентность возбудителей брюшного тифа, теперь доказано, что он не является прямым носителем вирулентности микроба и обнаружен у других серологических типов сальмонелл – *S.typhi*, *S.paratyphi C*, *S.dublin*. Структурно Vi-антиген представляет собой полимер N-ацетиламиногексурановой кислоты. Присутствие его на поверхности тела бактерий препятствует агглютинабельности их в О-сыворотке, т.е. делает бактерии «О-инагглютинабельными»

термолабильный поверхностный К-антиген;

М-антиген (слизистый) обнаружен у слизистых штамов *S. paratyphi B*, *S. dublin* и некоторых других.

31. При серологической идентификации во внимание принимаются три основных антигена (О, Н, Vi). Этот принцип положен в основу диагностической антигенной схемы Кауфмана-Уайта. Основным методом типирования сальмонелл остается серотипирование, точный метод, используемый для эпидемиологической характеристики возбудителя. Современные молекулярно-генетические методы не заменяют серотипирование, а лишь дополняют его, позволяя дифференцировать штаммы в пределах одного серотипа.

32. В соответствии с рекомендациями Референс-центра Всемирной Организации Здравоохранения по исследованию сальмонелл (институт Пастера, Париж), в большинстве стран мира для серотипирования сальмонелл и эпидемиологического надзора за сальмонеллезамы применяется схема Кауфмана-Уайта (2001). В ней содержатся сведения о серотипах сальмонелл известных на 31 декабря 2000 года с учетом изменений в таксономии рода *Salmonella* и номенклатуре серотипов, полученные за последние 30 лет в результате молекулярно-генетических исследований, схема насчитывает 2501 серологический вариант. Сокращенная схема Кауфмана-Уайта согласно приложению 3 к настоящей Инструкции. Полнотекстовую версию схемы Кауфмана-Уайта (2001) можно получить на сайте ГУ РЦГЭиОЗ www.rcheph.by

33. Критерии диагностики. Доказательством этиологической роли возбудителя является выделение возбудителя одного и то же серологического типа с дальнейшим определением биоваров и фаговаров (эпидемиологических маркеров) от больных, подозреваемых источников инфекции (людей или животных, больных или бактерионосителей) и возможных факторов передачи инфекции. С целью выявления возможного источника инфекции и подтверждения клинического диагноза у больных необходимо проведение серологических исследований для обнаружения в сыворотке крови обследуемых специфических антител.

34. Бактериологические исследования клинического материала.

34.1. Первый день.

Испражнения суспендируют в ИХН в соотношении 1:5 или 1:10 и засевают в чашки Петри с дифференциально-диагностическими средами (висмут-сульфит агар, Плоскирева, Эндо, агар с эозин-метиленовым синим (далее ЭМС-агар)) и одновременно не разведенные испражнения вносят в среду обогащения (селенистый бульон, магниевую среду, среды Мюллера или Кауфмана), в соотношении

1:5. Для одновременного выделения шигелл и сальмонелл целесообразно использовать высокоселективные среды (среда для сальмонелл и шигелл (SS-агар), ксилозо-лизин-дезоксихолатный (XLD-агар). Если испражнения доставлены в консерванте, каплю взвеси наносят на поверхность плотной среды у края чашки и тщательно растирают стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности среды и одновременно, испражнения доставленные в фосфатно-буферной смеси, засевают в среду обогащения двойной концентрации в соотношении 1:1, в глицериновом консерванте – в среду обогащения обычной концентрации в соотношении 1:5. При взятии материала ректальным тампоном его погружают в среду обогащения после посева на пластинчатые среды.

Кровь засевают в 10-20% желчный бульон или среду Рапопорт в соотношении 1:10.

Мочу после центрифугирования или без него, засевают в чашки Петри с плотными средами (Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар, ЭМС-агар), а также среды обогащения, не центрифугированную мочу – в среды двойной концентрации в соотношении 1:1.

Желчь (дуоденальное содержимое) засевают в чашки с плотными средами (Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар, ЭМС-агар) и во флаконы со слабощелочным питательным бульоном в соотношении 1:10. В последующие 3-5-7 сутки делают высевы на плотные среды, как из бульона, так и из пробирок с дуоденальным содержимым, которые содержат в термостате при температуре $37+1^{\circ}\text{C}$.

Рвотные массы и промывные воды засевают на плотные среды (Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар, ЭМС-агар) и в среды обогащения двойной концентрации в соотношении 1:1.

Спинально-мозговую жидкость засевают в среды обогащения и на плотные среды (Эндо, ЭМС-агар).

Пунктат воспалительных очагов засевают на плотные среды и в среды обогащения в соотношении 1:5.

При исследовании секционного материала кусочки органов, мезентериальные узлы и отмытые от содержимого кусочки кишечника тщательно размельчают с добавлением нескольких миллилитров ИХН. После отстаивания взвеси надосадочную жидкость засевают пипеткой на плотные среды и в среды обогащения. Кровь, мочу, желчь исследуют соответственно.

Все посева помещают в термостат при температуре $37+1^{\circ}\text{C}$ на 18-20 часов.

34.2. Второй день.

Просматривают посевы на плотных питательных средах в чашках Петри и пересевают подозрительные колонии в пробирку с комбинированной средой (Клиглера, Олькеницкого, трехсахарный агар с солями железа (TSI) и др.). Посевы инкубируют в термостате при температуре $37+1^{\circ}\text{C}$, 18-24 ч.

На висмут-сульфит агаре сальмонеллы, как правило, растут в виде черных колоний, с характерным металлическим блеском, при этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией, а также зеленоватых с темно-зеленым ободком.

На среде Плоскирева колонии бесцветны, но более плотные и несколько меньших размеров.

На среде Эндо (Мак-Конки) сальмонеллы растут в виде круглых, бесцветных или слегка розоватых прозрачных нежных колоний.

На ЭМС-агаре колонии прозрачные, слабо-розовые или розово-фиолетовые.

На SS-агаре, на XLD-агаре сальмонеллы образуют колонии красного цвета с черным центром, за счет образования H_2S .

Посевы на висмут-сульфит агаре просматривают дополнительно через 48 часов.

Производят высев из среды обогащения на плотные питательные среды. Из посевов желчи в бульон и из исходной желчи, содержащихся в термостате, производят высев на чашки со средами Эндо, Плоскирева и висмут-сульфит агаром. Из посева крови в 10-20% желчный бульон или среду Рапопорт производят высев на чашку со средой Эндо, а исходный посев крови снова помещают в термостат, высевы повторяют на 3-4-6 и 10 сутки.

34.3. Третий день.

Производят идентификацию культур, высеянных на комбинированную среду. По совокупности биохимических свойств, выявленных на комбинированной среде, делают предварительное заключение о возможной принадлежности культуры к роду сальмонелла, а также подбирают необходимый минимум дифференциальных тестов для определения рода и производят посевы на соответствующие среды, согласно приложению 4 к настоящей Инструкции. На этом этапе также проводят ориентировочную серологическую пробу в реакции агглютинации на стекле с поливалентными сыворотками (АВСДЕ и редких групп).

Типичными для бактерий рода *Salmonella* являются культуры, ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, образующие сероводород. Дальнейшему изучению подвергают также лактозоположительные бактерии, или бактерии не образующие сероводород, но обязательно ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа.

На третий день исследования производят также просмотр чашек с посевами из сред обогащения, и подозрительные колонии отсевают на комбинированную среду.

Если при первичном посеве и при высеве из сред обогащения подозрительных колоний не обнаружено, может быть выдан ответ об отрицательном результате исследования.

Посевы на висмут-сульфит агаре (из среды обогащения) независимо от результатов просмотра оставляют в термостате еще на 24 часа.

В этот же день просматривают чашки с первым высевом из флакона с засеянной кровью и дуоденальным содержимым, подозрительные колонии пересевают на комбинированную среду.

На третий день также производят посев выделенной культуры для испытания ее на чувствительность к сальмонеллезному О-фагу, являющемуся высокоспецифичным для этих бактерий, он лизирует 97,5 % штаммов сальмонелл. Для этого две капли четырех- или восемнадцати-часовой бульонной культуры испытуемого штамма наносят пастеровской пипеткой или петлей (диаметр 0,4-0,5 мм) на хорошо подсушенный слабощелочной агар в чашки Петри. После подсыхания

на одну из капель, петлей или пастеровской пипеткой меньшего диаметра, наносят О-бактериофаг, а на другую, в качестве контроля - каплю бульона. Фаг наносят в рабочем разведении, указанном на этикетке. Чашки с нанесенными культурами и О-бактериофагом помещают в термостат при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ на 18-20 часов, после чего учитывают результаты. Появление на месте нанесения фага четко очерченной зоны сливного лизиса или большего или меньшего числа негативных колоний, отчетливо видимых невооруженным глазом, свидетельствует о чувствительности культур к бактериофагу. При отсутствии лизиса в местах нанесения фага будет сплошной рост культуры, как в контроле. О-фаг может быть использован для предварительного испытания культуры из колонии с чашки с дифференциальной средой.

Культура, лизировавшаяся О-фагом, является подозрительной на сальмонеллу и может быть прямо с чашки испытана в реакции агглютинации со смесью сальмонеллезных О-сывороток. Атипичные сальмонеллезные культуры в большинстве случаев чувствительны к О-фагу, в то время как культуры, лишь сходные с сальмонеллами по биохимическим свойствам (например, лактозонегативные *E.coli*), как правило, не лизируются этим фагом.

34.4. Четвертый день.

Производят учет результатов, биохимических тестов, выделенных культур. После подтверждения биохимическими тестами принадлежности культуры к роду *Salmonella*, проводят окончательную серологическую идентификацию. Для идентификации используют культуру выросшую на слабощелочном питательном агаре.

Серологическую идентификацию (определение серовара) сальмонелл начинают с испытания их в реакции агглютинации на стекле с поливалентной адсорбированной О-сывороткой к сальмонеллам групп ABCDE. При отсутствии реакции с указанной смесью, культуру испытывают с поливалентной сывороткой, включающей антитела к антигенам сальмонелл редких групп (11, 13, 15, 19, 22, 23 и др.). При получении положительных результатов с поливалентной сывороткой ABCDE культуру испытывают с отдельными О-сыворотками, для определения принадлежности ее к одной из О-групп. После установления принадлежности культуры к какой-либо О-группе (А,В,С,Д,Е) определяют полную структуру ее О-антигена, а затем испытывают культуру с монорецепторными Н-сыворотками, сначала первой фазы, а затем – второй и таким образом устанавливают антигенную формулу выделенной культуры, т.е. ее серовар в соответствии со схемой Кауфмана-Уайта. Для агглютинации с О-сыворотками культуру следует брать с верхней части роста на скошенном агаре, для агглютинации с Н-сыворотками - из самой нижней части роста культуры или из конденсата, где располагаются особи с наиболее развитым Н-антигеном.

При серологической идентификации культуры возможны трудности в выявлении Н-антигена или одной из его фаз. Для выявления отсутствующей фазы Н-антигена используют феномен роения по Свену - Гарду. Принцип его заключается в том, что на неплотном агаре (0,9-1%) роятся все подвижные микробы. Если добавить к агару 1-2 капли сыворотки известной нам фазы, т.е. той фазы, которая была определена, то она свяжет выявленный антиген, а особи микробов, богатые другим, неизвестным антигеном будут бурно роиться. Этот антиген легко может

быть выявлен при испытании культуры, взятой с края макроколонии, в реакции агглютинации. Для приготовления 1,0% агара к 15 мл 2% агара добавляют 15 мл мясопептонного бульона. Охлаждают до 45⁰С, выливают в чашку Петри, подсушивают в термостате при 37+1⁰С – 15-20 мин. В центр чашки на агар наносят 1-2 капли сыворотки, соответствующей выявленной фазе Н-антигена. После того, как сыворотка впитается в агар, на то же место петлей наносят испытуемую культуру (18-часового роста на скошенном агаре), диаметром 3-4 мм. Чашки инкубируют при 37+1⁰С в течение 18-20 часов. На следующий день с края микроколонии берут культуру и испытывают ее в реакции агглютинации на стекле с соответствующими монорецепторными Н-сыворотками.

В этот же день производят просмотр чашек со вторым высевом дуоденального содержимого из бульона и третий высев из последнего на плотные среды. При отрицательных результатах первых двух высевок из желчного бульона с посевом крови, высевы повторяются на 5-й и 10-й дни.

При идентификации культур, подозрительных на сальмонеллы, чаще всего вызывают затруднение бактерии биохимически сходные с сальмонеллами, но неагглютинирующиеся сальмонеллезными сыворотками, либо дающие агглютинацию, но отклоняющиеся по биохимическим свойствам. В таких случаях, прежде всего, необходимо убедиться в чистоте культуры, для чего следует произвести ее рассев на чашку со средой Эндо, отобрать наиболее типичные колонии и подвергнуть их дополнительному изучению.

В случае выделения культур, агглютинирующихся смесью О-сывороток редких групп, но неагглютинирующихся ни одной из О-сывороток, входящих в смесь, необходима постановка дополнительных биохимических тестов. Тесты, с помощью которых проводят дифференциацию бактерий рода *Salmonella* с другими представителями семейства *Enterobacteriaceae*, согласно приложению 5 к настоящей Инструкции.

35. Исследование пищевых продуктов.

35.1. Неселективное предварительное обогащение. Навеску продукта, в массе (объеме) которой нормативно-технической документацией на анализируемый продукт предусматривается отсутствие бактерий рода *Salmonella*, засевают в забуференную пептонную воду. Соотношение массы (объема) продукта и забуференной пептонной воды 1:9. При посеве жидких высококислотных продуктов рН продукта перед посевом доводят до 7,0±0,2. При посеве твердых высококислотных продуктов доводят рН до 7,0±0,2 в посевах. Доведение рН проводят асептически при помощи стерильных растворов гидроокиси натрия и соляной кислоты. Посевы инкубируют при температуре 37+1⁰С в течение 18-20 часов.

35.2. Селективное обогащение. Культуры, полученные после инкубирования, пересевают в две среды для селективного обогащения. Для этого 10 см³ культуры переносят в 100 см³ магниевой (селенитовой) среды и в 100 см³ тетраэтилатной среды. Посевы инкубируют в течение 24-48 часов на магниевой (селенитовой) среде при температуре 37+1⁰С, а на тетраэтилатной среде – (43±1)⁰С.

35.3. Выделение и идентификация культур на агаризованных дифференциально-диагностических средах. Культуры через 24-48 часов пересевают со сред обогащения на дифференциально-диагностические питательные среды (висмут-

сульфит агар, среду Плоскирева, среду Эндо (или Левина)), инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов. После 24 часов инкубирования проводят предварительный учет результатов, а после 48 часов – окончательный. Отмечают рост колоний характерных для бактерий рода *Salmonella* на дифференциально-диагностических средах. При наличии характерных колоний проводят их дальнейшее изучение. Проводят высев со сред обогащения через 48 часов инкубирования на дифференциально-диагностические среды.

35.4. Проводят окончательный учет результатов. При отсутствии в посевах характерных для бактерий рода *Salmonella* колоний дают заключение об отсутствии бактерий рода *Salmonella* в анализируемой навеске продукта. При наличии характерных колоний проводят их дальнейшее изучение как описано выше.

36. Для уменьшения риска получения ложно отрицательных результатов существуют многочисленные методы выделения сальмонелл. Одним из таких методов является метод в соответствии с ISO-6579 стандартом. При выделении сальмонелл из пищевых продуктов и испражнений проводится предварительное обогащение на неселективной питательной среде больших порций образца и селективное обогащение с использованием двух селективных сред. Объем образца определяет чувствительность исследования, чем больше объем исследуемого образца, тем выше чувствительность исследования. Важно, что соотношение между объемом образца и бульоном предобогащения должно составлять 1:9.

36.1. Первый день. Неселективное предобогащение. К 25 г пищевого продукта или испражнений добавить 225 мл забуференной пептонной воды (соотношение объема образца и воды 1:9), перемешать, инкубировать при $37+1^{\circ}\text{C}$ 16-20 часов.

36.2. Второй день. Селективное обогащение. Поместить 1 мл предобогащенной смеси в 10 мл тетраэтилатного бульона (Мюллер-Кауфмана), инкубировать при $37+1^{\circ}\text{C}$ 18-24 часа, 0,1 мл предобогащенной смеси поместить в 10 мл Раппорт-Вассилиадис соево- пептонного бульона, инкубировать при $41,5^{\circ}\text{C}$ 18-24 часа.

36.3. Третий день. Посев образцов на селективные питательные среды. Образцы из тетраэтилатного бульона и Раппорт-Вассилиадис соево- пептонного бульона высевать петлей на XLD-агар и агар с бриллиантовым зеленым (BGA-агар), инкубировать при $37+1^{\circ}\text{C}$ 18-24 часа.

36.4. Четвертый день. Регистрация результатов посева на XLD-агаре и BGA-агаре. На XLD-агаре колонии типичные для рода сальмонелла имеют красную периферическую зону с черной центральной частью. Иногда периферическая часть колоний может быть розового цвета. На BGA-агаре цвет колоний варьирует от розово-серого до красного. Отсев подозрительных колоний на простой питательный агар для дальнейшей биохимической идентификации и серотипирования.

36.5. Пятый день. Биохимическое подтверждение и серотипирование сальмонелл. Колонии выделенной чистой культуры, выращенной на питательном агаре инокулировать на: TSI-агар, агар с мочевиной, L-лизин-декарбоксилазный тест, тест на β -галактозидазу, реакцию Фогес-Проскауэр, тест на индол. Инкубировать при $37+1^{\circ}\text{C}$ 18-24 часа. Серотипирование сальмонелл выполняется путем идентификации O-антигена и H-антигенов как описано выше.

36.6. Шестой день. Регистрация результатов биохимической идентификации. Биохимические свойства сальмонелл согласно приложению 6 к настоящей Инструкции.

ГЛАВА 4 БАКТЕРИИ РОДА SHIGELLA

37. Шигеллы – бактерии, относящиеся к семейству Enterobacteriaceae, роду *Shigella*. Род состоит из 4-х видов (подгрупп): А – *S.dysenteriae* (типовой вид); В – *S.flexneri*; С – *S.boydii* и D – *S.sonnei*, которые вызывают бактериальную дизентерию (шигеллез) – антропонозную кишечную инфекционную болезнь с преимущественным поражением толстой кишки. Разделение на виды основано на определении биохимических характеристик и антигенного строения. (Классификация бактерий рода *Shigella* согласно приложению 7 к настоящей Инструкции).

38. Шигеллы – прямые грамотрицательные неподвижные палочки с закругленными концами (0,7-1,0 x 1-3 мкм), оксидазоотрицательные, каталазоположительные, не образуют спор. Хемоорганотрофы, обладающие дыхательным и броодильным типами метаболизма. Факультативные анаэробы, оптимальная температура роста 37+1⁰С.

39. Пищевые продукты, содержащие бактерии рода *Shigella*, могут быть причиной заболеваний, протекающих по типу пищевых бактериальных отравлений. Среди продуктов, которые могут вызвать массовые заболевания, протекающие клинически по типу пищевой токсикоинфекции, чаще всего регистрируются молоко и молочные продукты, изделия из отварного мяса (паштеты, мясные салаты).

40. Шигеллы довольно устойчивы во внешней среде: на ткани и бумаге сохраняются до 1 месяца, в высушенных испражнениях до 5 месяцев, в почве-3-4 месяца, в воде до 15 дней. На овощах и фруктах остаются живыми не более 2 недель, в молоке и молочных продуктах – несколько недель. При 60⁰С погибают в течение 15-20 минут, при кипячении-мгновенно.

41. Биохимические свойства бактерий рода *Shigella*, согласно приложению 8 к настоящей Инструкции, свидетельствуют о малой биохимической активности этих бактерий. Ряд реакций характерен для представителей всего рода. Так, все шигеллы неподвижны, не образуют сероводорода из неорганических соединений серы, не гидролизуют мочевины, не утилизируют малонат натрия, цитрат в среде Симонса как единственный источник углерода и D-тарtrat, не продуцируют ацетон в реакции Фогес-Проскауэра, не обладают фенилаланиндезаминазой, лизиндекарбоксилазой и желатиназой, не вызывают щелочения среды Кристенсена, не растут в присутствии KCN, не ферментируют адонит и инозит, но дают положительную реакцию с метиловым красным. Образование индола варьируемо. Шигеллам отдельных видов присущи свои биохимические особенности, согласно приложению 9 к настоящей Инструкции.

41.1. Характерным для *S.dysenteriae* является их слабая ферментативная активность, они ферментируют глюкозу без газообразования. Поскольку они не разлагают маннит, а другие виды его ферментируют, они также известны как маннитнегативные шигеллы.

41.2. Более биохимически активны *S. flexneri* сероваров 1-5 и варианты X и Y, которые постоянно ферментируют маннит, трегалозу, а вариабельно-мальтозу, сорбит, арабинозу, рафинозу, рамнозу и некоторые штаммы-замедленно сахарозу. Своеобразна способность *S. flexneri* 6 сбразивать или не сбразивать маннит и образовывать газ в глюкозе.

41.3. *S. boydii* также относятся к маннитположительным видам. По большинству биохимических реакций они вариабельны. К числу отрицательных относят реакции в средах с лактозой, сахарозой и орнитином (кроме серовара 13).

41.4. Наиболее активны по ферментативным свойствам *S. sonnei*. Они способны, хотя и замедленно ферментировать лактозу и сахарозу, постоянно ферментируют маннит, рамнозу, мальтозу, арабинозу, трегалозу, обладают арнитиндекарбоксилазой и β -галактозидазой, вариабельны по утилизации муката и сбразиванию ксилозы, рафинозы, глицерина, целлобиозы; постоянно отрицательны в отношении дульцита, индола.

42. Антигенная структура шигелл представлена O- и K-антигенами. Термолабильные оболочечные K-антигены обнаружены у всех шигелл (за исключением *S. flexneri* и *S. sonnei*). Они способны маскировать O-антигены и тем самым блокировать агглютинацию бактерий O-антисыворотками (действие снимают кипячением в течение 1 часа). Термостабильные соматические O-антигены разделяют на типовые и групповые. Соответственно шигеллы разделяют на подгруппы (виды). Вид *S. dysenteriae* (подгруппа A) представлен 12 сероварами, в своем большинстве серологически обособленными. Вид *S. flexneri* (подгруппа B) имеет 13 сероваров и подсероваров, перекрестно реагирующих между собой за счет многочисленных групповых антигенов. Вид *S. boydii* (подгруппа C) представлен 18 сероварами, не имеющим между собой заметного антигенного родства, за исключением тесно связанных сероваров 10 и 11. Вид *S. sonnei* (подгруппа D) серологически однороден.

43. Критерии диагностики. Доказательством этиологической роли возбудителя является выделение в очаге шигелл определенного серовара (подсеровара) от больных, подозреваемых источников инфекции (больных или бактерионосителей), из продуктов питания, смывов и т.д., идентичных по биовару и другим эпидемиологическим маркерам. Для выявления источника инфекции и подтверждения клинического диагноза у больных возможно проведение серологических исследований (РПГА) с целью обнаружения в сыворотке крови обследуемых специфических антител.

44. Бактериологические исследования.

44.1. Первый день. Обнаружение шигелл в исследуемом клиническом материале и пищевых продуктах проводят параллельно с обнаружением сальмонелл в тех же посевах и на тех же средах, описание которых приведено в главе 3 настоящей Инструкции. В качестве среды обогащения для шигелл применяют селенитовый бульон.

44.2. Второй день. Просматривают чашки с посевами. На дифференциально-диагностических средах шигеллы образуют небольшие (1-1,5 мм), круглые, слегка выпуклые, с ровными краями, бесцветные колонии, блестящей поверхностью, полупрозрачные, легко снимающиеся петлей с поверхности агара. Одновременно могут находиться колонии гладкой, шероховатой и переходной формы. Колонии

отсевают на комбинированную среду (Клиглер, Олькеницкого и др). С селенитовой среды накопления производят пересев на среды Плоскирева, Эндо, SS-агар. Все посева инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ 18-20 часов.

44.3. Третий день. Просматривают чашки с пересевами из селенитовой среды обогащения и отсевают подозрительные колонии на комбинированную среду, инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ 18-20 часов. Проводят идентификацию культур высеянных накануне на комбинированную среду. Для дальнейшего изучения отбирают культуры грамтрицательных палочек с характерными свойствами для шигелл: не расщепляющие лактозу и мочевины, не образующие сероводород, не образующие газ при ферментации глюкозы (исключая газообразование подвида *S. flexneri*), неподвижные. Среди *S. sonnei* встречаются биохимические варианты, ферментирующие лактозу до кислоты. На этом этапе изучаемые культуры подвергают дальнейшей биохимической идентификации, с использованием тестов минимального дифференцирующего ряда согласно приложению 4 к настоящей Инструкции, проводят ориентировочную серологическую пробу с основной поливалентной сывороткой, содержащей антитела к *S. flexneri* 1-6 и *S. sonnei*.

44.4. Четвертый день. Производят окончательную идентификацию культур по биохимическим свойствам и серологическую идентификацию.

45. При идентификации выделенных культур могут возникнуть некоторые затруднения: выделение культур шигелл с отклонениями от типичной характеристики по ферментативной активности, например, встречаются маннитнегативные варианты *S. sonnei* и *S. flexneri*, маннитферментирующие разновидности *S. dysenteriae* серовары 3-7, ксилозоферментирующий вариант *S. flexneri*, лактозоферментирующий вариант *S. boydii*; выделение инагглютинабельных дизентерийных культур: из-за наличия поверхностного антигена «К», в этом случае прогревание культуры в течение 1-1,5 часов при 100°C разрушает термолабильный К-антиген и агглютинация с О-сывороткой восстанавливается; из-за утраты типоспецифического антигена *S. flexneri*, селекционирование отдельных колоний с питательного агара, обладающих полным антигенным комплексом, позволяет выяснить истинный серовар культуры; выделение атипичных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, обнаруживающих сходство по биохимическим и серологическим свойствам с шигеллами. Дифференциальные биохимические признаки некоторых представителей наиболее часто встречающихся родов семейства *Enterobacteriaceae*, представлены в приложении 5 к настоящей Инструкции.

46. Серологическую идентификацию шигелл начинают с основной поливалентной сыворотки, содержащей антитела *S. flexneri* 1-6 и *S. sonnei*. При положительном результате используют поливалентные сыворотки к *S. flexneri* и *S. sonnei*. Определение серовара *S. flexneri* начинают с применения сероварспецифических (типовых) сывороток (I, II, III, IV, V, VI), а затем групповых (3, 4; 6; 7; 8), выявляющих подсеровар. Иногда свежевыделенные штаммы слабо агглютинируются. Необходимо провести 1-2 пассажа 4-часовой бульонной культуры с высевом на питательный агар, проверить чистоту культуры. При отсутствии агглютинации в основной поливалентной сыворотке штамм необходимо испытывать с поливалентными сыворотками к *S. dysenteriae*. Сбраживающие маннит штаммы с поливалентными сыворотками к *S. boydii*. Штаммы, обладающие культуральными и биохимическими свойствами, типичными для шигелл, но неагглютинирующиеся

шигеллезными сыворотками, следует испытывать с сыворотками провизорных сероваров.

47. Дополнительно целесообразно исследовать чувствительность выделенных культур к поливалентному дизентерийному фагу. Для этого используют следующую методику: на хорошо подсушенную чашку со слабощелочным агаром (рН 7,6) наносят пастеровской пипеткой каплю смыва 18-20 часовой агаровой культуры. На подсохшие капли пастеровской пипеткой наносят дизентерийный бактериофаг, после подсушивания чашки инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 18-20 часов. При положительном результате наблюдается задержка роста культуры на чашках с бактериофагом.

48. В затруднительных случаях при идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae* рекомендуется применить кератоконъюнктивальную пробу на морских свинок. При постановке этой пробы полную петлю (диаметром 5 мм) суточной агаровой культуры вносят в конъюнктивальный мешок глаза морской свинки под нижнее веко. Подавляющее большинство свежевыделенных дизентерийных бактерий вызывает у морских свинок специфический кератоконъюнктивит на 2-5 сутки: конъюнктура гиперимирована, роговица мутная, набухшая, с белесоватым оттенком, обильное гнойное отделяемое. Кроме шигелл кератоконъюнктивит могут вызывать патогенные кишечные палочки серотипа 0124:B17 и очень редко некоторые сальмонеллы (например, *S. typhimurium*), но эти энтеробактерии легко дифференцируются от шигелл по их биохимическим свойствам.

49. Для установления эпидемиологической метки (маркера-штамма) существует ряд методов.

49.1. Метод определения биовара основан на вариабельной способности различных штаммов шигелл ферментировать некоторые углеводы, или образовывать индол.

Метод определения биоваров *S. sonnei* основан на неодинаковой активности в отношении ксилозы, рамнозы и мальтозы, что позволяет подразделить их на 7 стабильных биоваров согласно приложению 10 к настоящей Инструкции.

Для определения биоваров *S. flexneri* 6 используют неодинаковую ферментацию ими глюкозы, маннита и дульцита, что позволяет выявить среди них 3 различных биовара согласно приложению 11 к настоящей Инструкции.

Определение биоваров *S. flexneri* 1-5 X- и Y-variant основано на биохимической активности в отношении мальтозы, арабинозы, сорбита и рамнозы, что позволяет разделить их на 15 биоваров согласно приложению 12 к настоящей Инструкции.

Установление биоваров *S. boydii* основано на неодинаковой активности их в отношении сорбита, глицерина, ксилозы, дульцита, что позволяет дифференцировать их на 8 биоваров согласно приложению 13 к настоящей Инструкции.

ГЛАВА 5

БАКТЕРИИ РОДА *ESCHERICHIA*

50. Эшерихии – палочковидные бактерии, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia*, который состоит из 5 видов: *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. blattae*.

51. Род образуют подвижные или неподвижные прямые палочковидные бактерии с закругленными концами, размером 0,6-1x2,0-6,0 мкм, многие имеют капсулу или микрокапсулу. Грамотрицательные, в мазках располагаются одиночно или парами. Факультативные анаэробы. Температурный оптимум для роста 37°C, ферментируют углеводы с образованием кислоты или кислоты и газа, оксидазоотрицательны и каталазоположительны.

52. Особенность рода состоит в том, что непатогенные разновидности эшерихий являются постоянными обитателями кишечника человека, животных, птиц и широко распространены в природе. Эшерихии – основная факультативно-анаэробная микрофлора кишечника человека. Основное медицинское значение имеет кишечная палочка (*Escherichia coli*), являющаяся типовым видом рода *Escherichia*. Наряду с кишечными палочками, обладающими непатогенными свойствами, имеются серовары обладающие свойствами патогенных возбудителей, они являются возбудителями эшерихиозов у человека.

53. *E. coli* имеют типичную для энтеробактерий форму и представлены короткими подвижными палочками с закругленными концами. На плотных средах бактерии образуют плоские выпуклые мутные S-колонии с ровными или слегка волнистыми краями (3-5 мм в диаметре), либо сухи плоские R- колонии с неровными краями. В жидких средах растут диффузно, вызывая помутнение среды и образование осадков. На селективно-дифференциальных средах колонии принимают цвет, соответствующий окраске среды. На агаре Эндо лактозоположительные эшерихии образуют фуксиновокрасные колонии с металлическим блеском, лактозоотрицательные – бесцветные, на среде Плоскирева – соответственно красные с желтым оттенком. Биохимические свойства *E. coli* согласно приложению 14 к настоящей Инструкции.

54. Эшерихии ферментируют углеводы с кислотообразованием: постоянно – глюкозу (с газом или без него), маннит; обычно ферментирует лактозу (иногда замедленно), не ферментирует адонит и инозит (крайне редко наблюдаются положительные реакции): другие углеводы и многоатомные спирты сбраживают variabelно; не образуют сероводород на средах с хлоридом железа; обычно не утилизируют цитрат, малонат: не имеют фенилаланиндезаминазы, уреазы, желатиназы: утилизируют ацетат, дают положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную Фогес-Проскауэра; постоянно имеют лизиндекарбоксилазу и не постоянно – орнитиндекарбоксилазу и аргининдегидролазу. Не растут в средах с KCN. По первым шести тестам, указанным в приложении 14 к настоящей Инструкции можно определить принадлежность выделенной культуры к *E. coli*.

55. По морфологическим, ферментативным и культуральным свойствам патогенные и непатогенные кишечные палочки не отличаются друг от друга, их дифференцировка основана на различиях в структуре антигена. Антигенная структура *E. coli* весьма сложная. Для построения антигенно-диагностических схем и серологической идентификации, наиболее важное значение имеют липополисахаридные (O-), жгутиковые белковые (H-), капсульные полисахаридные (K-) антигены. У эшерихий известно более 170 вариантов O-антигена, более 100 разновидностей K-антигена и около 60 разновидностей H-антигена. O-антиген термостабилен, H-антиген – термолабилен. K-антиген по чувствительности к прогреванию подразделяется на 3 типа: A, B и L. При проведении серологических

исследований для определения О-антигена необходимо иметь в виду своеобразие О-агглютинабельности, которое у штаммов, содержащих К-антиген, обычно обнаруживается после прогревания, когда разрушаются поверхностные антигены. Этот феномен получил название О-инагглютинабельности. L и В антигены термолабильны. Прогревание при 100⁰С в течение 1 часа приводит к полной инаktivации L-антигена и бактерии, содержащие такой антиген, хорошо агглютинируются О-сывороткой, не агглютинируются соответствующей L-сывороткой и не способны связывать L-антитела. Аналогичная обработка эшерихий, имеющих В-антиген, также делает бактерии агглютинабельными в О-сыворотке, но не лишает способности связывать соответствующие В-антитела и в отдельных случаях агглютинироваться В-сывороткой. А-антиген термостабилен. Агглютинабельность бактерий, обладающих А-антигеном в О-сыворотке достигается только лишь после прогревания их при 120⁰С в течение 2,5 часов.

56. У человека кишечная палочка вызывает кишечные инфекции, поражения мочевыводящих путей, бактериемии, менингиты и др. Этиологической причиной пищевых отравлений из числа *E. coli* обычно бывают разновидности, являющиеся возбудителями энтеральных эшерихиозов. *E. coli*, вызывающие диарею, разделяют на пять типов: энтеротоксигенные кишечные палочки (ЕТКП) - возбудители диареи путешественников, холероподобной диареи у детей и взрослых; энтероинвазивные кишечные палочки (ЕИКП) - возбудители поражений, напоминающие бактериальную дизентерию; энтеропатогенные кишечные палочки (ЕПКП) - основные возбудители диарей у детей 1-го года жизни; энтерогеморрагические кишечные палочки (ЕГКП) - возбудители геморрагического колита и гемолитико-уремического синдрома (наиболее частыми возбудителями бывают серовары O157:H7 и O26:H11); энтероагрегирующие кишечные палочки (ЕАКП) – возбудители диарей у детей. Серовары *E. coli* наиболее часто вызывающие кишечные инфекции, согласно приложению 15 к настоящей Инструкции. Кроме перечисленных в приложении сероваров возбудителями кишечных инфекций могут быть эшерихии других серологических групп. Антигенно-диагностическая схема сероваров *E. coli*, наиболее часто вызывающих кишечные инфекции представлена в приложении 16 к настоящей Инструкции.

57. Критерии диагностики. Возникновение пищевого отравления, вызванного эшерихиями, обычно связано с массивной контаминацией продуктов. В связи с этим значение имеет количественное определение степени обсемененности продуктов этими бактериями. В случае выделения штаммов эшерихий, подозрительных как возбудителей заболевания, необходимо установить идентичность культур выделенных из разных материалов (пищевые продукты, смывы, рвотные массы, промывные воды и др.) по морфологическим, ферментативным, культуральным свойствам и расшифровать их антигенную структуру. В целях установления эпидемических связей используется определение сероваров.

58. Бактериологическое исследование клинического материала.

58.1. Первый день. Испражнения засевают на среду (Эндо, ЭМС) таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний (готовят ряд разведений в изотоническом растворе хлорида натрия). Жидкие материалы засевают без разведения. Инкубируют в течение 18-20 ч. при 37+1⁰С.

58.2. Второй день. Изучают колонии выросшие на средах Эндо, ЭМС. При наличии только однотипных колоний для дальнейшего исследования намечают 10 колоний. При обнаружении 2-3 и более видов колоний намечают 3-5 колоний каждого вида. Поиск и первичный отбор колоний выросших на чашках первичного посева, проводят серологическим методом в реакции агглютинации на стекле с использованием поливалентной сыворотки ОКА. Оставшуюся часть колоний, давшей положительную реакцию с сывороткой ОКА, отсевают на скошенный агар и на одну из комбинированных сред для первичной идентификации.

58.3. Третий день. Культуры «подозрительные» на принадлежность к роду *Escherichia* (по данным комбинированной среды) повторно проверяют в реакции агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой ОКА и при положительном результате испытывают с поливалентными сыворотками (ОКБ, ОКС, ОКД, ОКЕ) или ОК-иммуноглобулинами. При наличии положительной реакции культуры засевают со скошенного агара в питательные среды для воспроизведения тестов минимального дифференцирующего ряда, необходимых для подтверждения принадлежности культуры к роду *Escherichia* согласно приложению 4 к настоящей Инструкции.

58.4. Четвертый день. При подтверждении принадлежности бактерий к эшерихиям проводят испытание в агглютинационном тесте на стекле с моновалентными ОК-сыворотками или иммуноглобулинами, входящими в поливалентную сыворотку, давшую положительную реакцию (живая культура), и определяют в агглютинационном тесте на стекле О-антиген с адсорбированными групповыми и факторными О-сыворотки (культура, прогретая 30 мин при 100°C), если таковые имеются. При наличии положительного результата реакции агглютинации с живыми и подогретыми культурами обозначают ОК группу изучаемого штамма в соответствии с использованными диагностическими препаратами. При отсутствии ОК- иммуноглобулинов и адсорбированных О-сывороток подтверждают принадлежность культур к соответствующей ОК-группе в пробирочном агглютинационном тесте с возрастающими разведениями ОК-сыворотки до ее О-титра, указанного на этикетке, в двух рядах пробирок (живая и подогретая 1 ч при 100°C). Учет результатов осуществляют через 18-20 ч инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$. Пересев культуры с установленной или ориентировочно определенной ОК-группой на глицериновый агар, скошенный в пробирке для типирования бактерий по Н-антигену в агглютинационном тесте на стекле (при наличии соответствующих диагностических препаратов). Инкубация 18-20 ч при $37+1^{\circ}\text{C}$.

58.5. Пятый день. Обозначение ОК-группы эшерихий при наличии положительного результата в соответствующей сыворотке: агглютинация до титра или половины титра К-антител (с живыми бактериями) и О-антител (с прогретыми бактериями). Серологическое типирование по Н- антигену культуры (с глицеринового агара) в агглютинационном тесте на стекле вначале в поливалентных, затем в моновалентных Н-сыворотках (входящих в соответствующую поливалентную, с которой реагировала культура). По совокупности определенных разновидностей О-, К- и Н-антигенов устанавливают серовар штамма эшерихий. При определении Н-антигена методом иммобилизации из пробирки с положительным результатом в поливалентной Н-сыворотке (рост бактерий только по ходу укола) производят посев культуры в пробирки, содержащие полужидкий агар и монова-

лентные Н- сыворотки, соответствующие поливалентной, давшей положительный результат иммобилизации. Инкубируют 18-20 ч при $37+1^{\circ}\text{C}$.

58.6. Шестой день. Учет иммобилизации культуры и при положительном результате обозначение соответствующего Н-антигена. По совокупности установленных разновидностей О-, К-, Н-антигенов определение серовара штамма эшерихий.

59. Исследование пищевых продуктов.

59.1. Для получения количественных показателей обсемененности продукта, из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений так, чтобы можно было определить в 1 г (см^3) продукта количество *E. coli*. По 0,1 или 0,2 см^3 навески продукт или его разведения наносят на поверхность двух параллельных чашек Петри со средой Эндо.

59.2. Для выявления *E. coli* в определенной навеске продукта навеску или его эквивалентное разведение вносят в среду Кесслера. Соотношение между количеством высеваемого продукта, или его разведением и питательной средой 1:9, а для сред двойной концентрации 1:1.

59.3. Посевы на агаризованных и жидких средах инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 ч. Посевы просматривают через 24 ч, отмечают положительные посевы в жидкие среды, окончательный учет проводят через 48 ч. Положительными считаются посевы в жидкие среды, в которых имеет место интенсивный рост микроорганизмов, проявляющийся в помутнении среды, образовании газа, подкисления среды (изменении цвета среды). Для подтверждения принадлежности микроорганизмов выросших на жидких средах к *E. coli* производят пересевы на поверхность среды Эндо. Инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ 24-48 ч.

59.4. Посевы на агаризованных средах просматривают, отмечают рост характерных колоний, принадлежность выросших колоний к *E. coli* проводят как описано при исследовании клинического материала, отбирают не менее чем 5 колоний, если при подтверждении характерных колоний в 80 % случаев, т.е. не менее чем в 4 из 5 колоний, подтвержден рост *E. coli*, то считают, что все характерные колонии, выросшие на чашке Петри принадлежат к *E. coli*. В остальных случаях количество *E. coli* определяют, исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для подтверждения. Пересчитывают их количество на 1г (см^3) исследуемого материала, общепринятым способом.

ГЛАВА 6

БАКТЕРИИ РОДА PROTEUS

60. В этиологии пищевых отравлений ведущую роль играют бактерии рода *Proteus*. Протеи широко распространены в природе и встречаются в почве, сточных водах, навозе. В кишечнике человека и животных присутствие этих микробов менее постоянно. Протей содержится в испражнениях только у 5-10% здоровых людей. Заболевания могут возникнуть при употреблении продуктов, обильно контаминированных этим возбудителем. Это могут быть мясные изделия, особенно из рубленого мяса, рыбные блюда, овощные салаты и др. Отличить *Proteus* и близкородственные к нему *Providencia* и *Morganella* от других представителей *Enterobacteriaceae* можно по признаку наличия фенилаланиндезаминазы. Призна-

ки позволяющие отличить *Proteus*, *Providencia* и *Morganella* согласно приложению 17 к настоящей Инструкции.

61. Бактерии рода *Proteus* относятся к семейству *Enterobacteriaceae*. Род состоит из 4 видов: *P.mirabilis*, *P.myofaciens*, *P.penneri*, *P.vulgaris*. Чаще вызывают заболевания у человека - *P.mirabilis*, *P.vulgaris*.

62. Род образуют прямые палочки с закругленными концами размером 0,4-0,8x1-3 мкм, грамотрицательные, бескапсульные, подвижные (перитрихи, подвижность более выражена при 20-22⁰С). Многие роятся, образуя ползучие колонии с отростками. Оксидазоотрицательные, каталазоположительные, реакция с метиловым красным положительная. По образованию индола, реакции Фогес-Проскауэра и пробе на среде Симмонса с цитратом виды различаются. Лизиндекарбоксилаза и аргининдигидролаза отсутствуют. Декарбоксилировать орнитин способен только *P.mirabilis*. Осуществляют окислительное дезаминирование фенилаланина и триптофана, гидролизуют мочевины. Разлагают тирозин, растут в присутствии KCN, обычно образуют H₂S, малонат не используют. Биохимические свойства представлены в приложении 17 к настоящей Инструкции.

63. В практических лабораториях для определения принадлежности выделенных бактерий к роду *Proteus* достаточно использовать ограниченное число тестов. Протеи растут на простых питательных средах, температурный оптимум 35-37⁰С, оптимум pH 7,2-7,4. Рост бактерий сопровождается появлением гнилостного запаха. На твердых средах жгутиковые (H-) формы характеризуются сплошным ростом. При посеве бляшкой бактерии дают феномен «роения». На среде Плоскирева формируют крупные (d 2-3 мм) полупрозрачные изолированные колонии правильных очертаний, слегка выпуклые с желтовато-розовым оттенком (в зоне роста среда подщелачивается и желтеет). На висмут-сульфит агаре через 48 ч образуют серо-коричневые колонии (с черно-коричневой зоной под ними), на агаре Эндо формируют бесцветные колонии. Вызывают помутнение жидких питательных сред.

64. Антигенная структура. У протеев обнаружены O-, H-, K-антигены. Диагностическое значение имеют: соматический O-антиген и жгутиковый H-антиген. O-антиген расположен в бактериальной клеточной стенке и представляет собой полисахаридно-липидно-белковый комплекс. Серологическую специфичность O-антигена определяет его полисахарид. O-антиген обладает термостабильностью. Термолабильный H-антиген является белковым соединением и содержится в жгутиках. Серовар бактерий рода *Proteus* устанавливается по сочетанию O- и H-антигенов с учетом их факторного состава.

65. Критерии диагностики. Доказательством этиологической роли протеев является массивное обнаружение этого микроба в пищевых продуктах, в испражнениях, в рвотных массах (10⁶ и более в 1г) при наличии клинических симптомов заболевания.

66. Бактериологические исследования.

66.1. Первый день. Для количественного учета и получения чистой культуры первичный посев исследуемого материала производят по 0,1 мл из десятикратных разведений в 0,1% стерильной пептонной воде, до разведения 10⁻⁶ в конденсационную воду свежекошенного мясо-пептонного агара по методу Шукевича.

ча и на поверхность питательных сред (Плоскирева, висмут – сульфит агар). Посевы помещают в термостат при температуре $37+1^{\circ}\text{C}$ на 18-24 часа.

66.2. Второй день. Просматривают посевы на скошенном мясо-пептонном агаре. Если регистрируют ползучий нежный вуалеобразный рост, то определяют титр по наименьшему количеству засеянного материала, в котором обнаружен рост бактерий рода *Proteus*. После инкубации в течение 18-24 часов в термостате при $37+1^{\circ}\text{C}$ чашки с посевами просматривают и отмечают характерные колонии, подлежащие дальнейшему исследованию. Наличие на среде Эндо или ЭМС, при выявлении других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, ползучего роста дает основание определить в исследуемом материале бактерии рода *Proteus*. Для биохимического и серологического типирования необходимо изучение отдельных изолированных колоний. Для получения изолированных колоний со среды Эндо или ЭМС делается пересев в пробирки с бульоном и после 4-5 часовой инкубации при $37+1^{\circ}\text{C}$ повторный пересев на слабщелочной агар с 0,4% карболовой кислотой, или среду Плоскирева, SS-агар, висмут-сульфит агар. На следующий день изолированные колонии подвергаются дальнейшему изучению по обычной схеме. Если рост 18-24-часовой культуры однородный, то для дальнейшего изучения используют не менее трех колоний, при росте разных колоний для их изучения надо брать больше колоний, различных по внешнему виду. Для определения родовой принадлежности изучаемого штамма изолированные колонии отсеивают в пробирку с мясопептонным бульоном, из которого после 4-5-часовой инкубации при $37+1^{\circ}\text{C}$ производят посевы на следующие среды: бульон или пептонную воду для определения индола, среду с мочевиной для определения фермента уреазы, агар Клиглера для определения ферментации глюкозы и образования сероводорода, 6% или 10% лактозу, 0,5% мальтозу, 0,3% полужидкий агар для определения подвижности; скошенный слабщелочной агар для серологического типирования.

66.3. Третий и четвертый дни. Учитывают результаты ферментативной активности культур, выделенных накануне. Грамотрицательные культуры, ферментирующие глюкозу, гидролизующие мочевины, образующие сероводород и не ферментирующие лактозу, оценивают как бактерии, принадлежащие к роду *Proteus*. На основании способности к индолообразованию и ферментации мальтозы определяют принадлежность к одному из видов: штаммы, ферментирующие мальтозу и образующие индол, относят к *Proteus vulgaris*; штаммы, не ферментирующие мальтозу и не образующие индол, к *Proteus mirabilis*. При необходимости более углубленного изучения ферментативных свойств выделенную культуру изучают по всем тестам, согласно приложению 17 к настоящей Инструкции.

66.4. Если изучаемый штамм продуцирует индол и сероводород, не ферментирует (или ферментирует) лактозу и не расщепляет мочевины, необходимо произвести дифференциацию между редко встречающимися видами рода *Proteus*, не гидролизующими мочевины или ферментирующими лактозу, и индолположительными вариантами *Salmonella* и *Citrobacter*. Такие штаммы следует в первую очередь проверить на наличие фенилаланиндезаминазы. Для определения фенилаланиндезаминазы производят посев в пробирки со скошенным агаром, содержащим фенилаланин. Через 18-24 часа инкубации при $37+1^{\circ}\text{C}$ на поверхность среды с ростом наслаивают 10% хлорное железо (FeCl_3). Появление интенсивной

зеленой окраски свидетельствует о положительной реакции. Штаммы, дезаминирующие фенилаланин, относятся к роду *Proteus*. Штаммы, не образующие фенилаланиндезаминазу, подвергают дальнейшему изучению для определения их принадлежности к другим родам семейства *Enterobacteriaceae*.

66.5. Серологическое типирование. Штаммы, отнесенные на основании биохимических свойств к роду *Proteus*, подвергают серологическому типированию. Определение сероваров возможно у *P.vulgaris* и *P.mirabilis* при помощи специфических О- и Н-сывороток в реакции агглютинации на стекле в соответствии с антигенно-диагностической схемой этих бактерий (в схеме представлены 49 серологических О-групп и 19 Н-антигенов) согласно приложению 18 к настоящей Инструкции и «Наставлениям по применению агглютинирующих протейных О- и Н-сывороток. Для реакции агглютинации используют суточную культуру на слабощелочном питательном агаре, 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 вначале поливалентные, а затем моновалентные Н-сыворотки.

66.6. При отсутствии диагностических Н-сывороток и необходимости решить вопрос однородны ли по Н-антигену выделенные штаммы (например, при определении источника инфекции в очаге) может быть использован феномен Диенеса. Для выявления феномена Диенеса чашку Петри с 2% слабощелочным питательным агаром делят пополам, на каждую половину среды (на полюсах диаметра чашки) засевают по 1 капле 4-5 часовой бульонной культуры, инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ 18-20 ч. 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 0,5-2 мм.

66.7. Разработаны антигенно-диагностические схемы других видов рода *Proteus*, *Providencia* и *Morganella*, но отсутствуют производственные диагностические сыворотки. В качестве эпидемических маркеров используют определение биоваров и чувствительность к антибиотикам. Дифференциация *Providencia rettgeri* на биовары согласно приложению 19 к настоящей Инструкции, дифференциация *Providencia alcalifaciens* и *Providencia stuartii* согласно приложению к 20 настоящей Инструкции.

ГЛАВА 7

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

67. *Vibrio parahaemolyticus* относится к роду *Vibrio*, семейству *Vibrionaceae*.

68. *Vibrio parahaemolyticus* – галофильный вибрион, вызывающий острые диареи. Вызванные им поражения часто регистрируются в странах Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки (до 20% всех диарей). Основные факторы передачи возбудителя инфекции – блюда из морских продуктов, длительно хранившихся в теплом месте и приготовленные с нарушениями технологического процесса. Реже наблюдаются поражения вызванные употреблением сырых моллюсков и рыбы. Возбудитель синтезирует энтеротоксин (гемолизин), вызывающий энтерит. Клинические проявления наблюдаются у 50% инфицированных лиц – характерны сильные боли в животе и водянистая обильная диарея,

развивающаяся в течение 24 часов после инфицирования. Заболевание наступает только при обильном обсеменении (более 10^6 клеток в 1 грамме) пищи живыми клетками *V. parahaemolyticus*. Энтеропатогенные штаммы *V. parahaemolyticus*, обнаруженные в выделениях больных, обладают гемолитическими свойствами, в то время как штаммы, выделенные из рыбы, послужившей причиной заболевания и из морской воды, не обладают этими свойствами. Этот феномен получил название по имени автора, его описавшего «Kanagawa»-феномен.

69. *Vibrio parahaemolyticus* – прямые или изогнутые грамотрицательные палочки (0,5-0,8x1,4-2,4мкм), полиморфные, подвижные, факультативно- анаэробные. Вибрион хорошо растет на обычных питательных средах, содержащих 2-3% NaCl. Оптимальная температура роста 30-37⁰С, оптимальный рН 7,5-8,8. Основные дифференциальные признаки *V. parahaemolyticus* и других галофилов согласно приложению 21 к настоящей Инструкции.

70. *V. parahaemolyticus* имеет три антигена О-, К-, Н-. Серологическая классификация основана на учете О- и К-антигенов, т.к. Н-антигены идентичны. О-антиген соматический, термостабильный, К-антиген капсульный и при 100⁰С разрушается. По структуре О-антигена бактерии разделяют на 14 серогрупп, внутри их разделяют на 61 серовар по структуре К-антигенов. Серологическая идентификация с помощью реакции агглютинации проводится в соответствии с «Инструкцией по применению агглютинирующих сывороток».

71. Критериями диагностики заболеваний, вызванных *V. parahaemolyticus*, является обнаружение их в подозреваемом продукте в количестве 10^6 и более клеток в 1 г (см³), с одновременным обнаружением того же типа возбудителя в кале пострадавших.

72. Бактериологические исследования.

72.1. Первый день. Из подготовленных к исследованию образцов (продукты и испражнения) готовят ряд десятикратных разведений в 3% пептонно-солевом бульоне, высевают по 0,1 мл на поверхность дифференциально-диагностической среды (висмут-сульфит агар с феноловым красным, тиосульфат-цитрат-желчно-сахарозный агар (TCBS-агар.)). Засеянный материал тщательно втирают шпателем. Производят посев 1 мл неразведенного материала в 10 мл среды обогащения (висмут-сульфит солевой бульон). Посевы инкубируют при 37+1⁰С 18-24 часа.

72.2. Второй день. Просматривают чашки с первичными посевами. Типичные колонии *V. parahaemolyticus* на висмут-сульфит агаре с феноловым красным бесцветны, т.к. не ферментируют сахарозу, микроорганизмы, ферментирующие сахарозу, имеют темно-коричневый цвет, бактерии группы кишечной палочки на висмут-сульфит агаре с феноловым красным не растут, на TCBS-агаре образуют оливково-зеленые колонии, на этой среде так же выявляют способность *V. parahaemolyticus* утилизировать орнитин, в отличии от *V. cholerae*. Производят микроскопию в окрашенных по Граму препаратах и подсчет с последующим пересчетом на 1 г (см³) продукта, по общепринятой методике, 10 типичных колоний высевают на скошенный 2-3% солевой агар для дальнейшей идентификации. Производят пересев со среды обогащения на висмут-сульфит агар с феноловым красным, или на TCBS-агар так, чтобы получить рост изолированных колоний.

72.3. Третий день. Проверяют чистоту выделенных культур при микроскопии окрашенных по Граму препаратов. Пересевают чистые культуры со скошенного агара на: пептонный бульон без соли; пептонные солевые бульоны, содержание 6%, 8% и 10% NaCl; полужидкий агар для определения подвижности. Все посеы инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 18-24 часов.

72.4. Четвертый день. Сравнивают рост культур на средах: пептонный бульон без соли и пептонно-солевые бульоны. *V.parahaemolyticus* хорошо растет в солевом бульоне с 6-8% NaCl и не растет или растет очень слабо в бульонах без соли и с 10% NaCl. Определяют подвижность культур по характеру роста на полужидком агаре. Засевают 24-часовые агаровые культуры на среды Гисса, содержащие сахарозу и арабинозу, посеы инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 18-24 ч, бульон с глюкозой для определения образования ацетилметилкарбинола, посеы инкубируют при $25-27^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов. Для определения энтеропатогенности выделенных галофилов по их гемолитическим свойствам производят пересев культур из солевого бульона по секторам на хорошо подсушенную чашку с кровавым солевым агаром (среда Wagatsuma). Инкубируют при 35°C 18-20 часов.

72.5. Пятый и шестой дни. Учет результатов ферментации углеводов. *V.parahaemolyticus*, как правило, не ферментирует сахарозу и ферментирует арабинозу. Постановка реакции на ацетилметилкарбинол. К 1 мл бульонной культуры добавляют 0,6 мл 5% альфа-нафтола и после смешивания 0,2 мл 40% водного раствора щелочи (KOH). Розовое окрашивание, наступившее через 2-24 часа, указывает на наличие ацетилметилкарбинола. Учет результатов наличия гемолиза определяют по зонам просветления среды вокруг колоний. *V. parahaemolyticus*, обладающий энтеропатогенными свойствами, вызывает гемолиз эритроцитов.

ГЛАВА 8 BACILLUS CEREUS

73. *B.cereus* – вид условно-патогенных бактерий рода *Bacillus*. *B.cereus* почвенный микроорганизм широко распространенный во внешней среде – воде, воздухе и пыли помещений, на оборудовании предприятий пищевой промышленности и общественного питания. *B.cereus* обнаруживается в продуктах питания, где при благоприятных условиях размножается до количеств 10^6-10^7 в 1 г (см^3) и может вызывать пищевые токсикоинфекции. Низкая требовательность к условиям, необходимым для роста, приводит к тому, что *B.cereus* может размножаться на любом продукте питания и любой продукт при его массивном обсеменении может привести к возникновению заболевания. В связи с *B.cereus* описаны отравления, вызванные мясными и рыбными продуктами, кондитерскими изделиями, растительными и молочными продуктами.

74. В мазках, окрашенных по Граму, *B. cereus* имеет вид крупных, грамположительных палочек, размером $0,5-2,5 \times 1,2-10$ мкм со слегка закругленными концами, лежащих в виде цепочек или штакетообразных скоплений, реже – отдельно друг от друга. Аэробы или факультативные анаэробы. В висячей капле подвижен, встречаются штаммы со слабо выраженной подвижностью и вовсе лишенные подвижности. На поверхности МПА образует крупные распластанные колонии белого цвета со слегка изрезанными краями. На средах с желтком колонии окружены широкой зоной глубокого равномерного беломатового коагулята

(положительная реакция на лецитиназу). На полимиксиновых средах с ТТХ (2, 3, 5 трифенилтетразолий хлорид) колонии *V. cereus* зернистые, матовые, ярко рубинового цвета на фоне зоны белого коагулята. На кровяном агаре колонии *V. cereus* сероватой окраски, зернистые в отраженном свете, с перламутровым отливом в проходящем свете, окружены зоной гемолиза разной интенсивности. На столбике скошенного агара *V. cereus* дает сплошной белый рост, иногда мучнистого вида. На жидких питательных средах рост сопровождается помутнением бульона, образованием хлопьевидного осадка белого цвета (25-30% штаммов) и нежной белой пленки на поверхности среды. Все штаммы *V. cereus* створаживают молоко, частично пептонизируя его на 6-10 сутки. Около 85% штаммов разжижают желатин в течение 1-4 суток. Все без исключения штаммы *V. cereus* дают положительную реакцию на лецитиназу и ацетилметилкарбинол (р-ция Фогес-Проскауэра), расщепляют до кислоты глюкозу и мальтозу.

75. Оптимум роста для *V. cereus* 30⁰С, споры могут прорасти при широком интервале температур от 3-5⁰С до 70⁰С и давать рост при 6-55⁰С (около 4%), а при температуре 12-39⁰С достаточно интенсивный рост дают все штаммы данного микроорганизма. *V. cereus* способен давать рост в широком интервале рН от 4 до 12,5 и наиболее интенсивно от 7 до 9,5. Достаточно устойчив он к действию поваренной соли, сахара, поваренная соль задерживает размножение этого микроорганизма лишь при 10-15% содержании. *V. cereus* легко и быстро образует споры. Содержание спор уже в 2-суточной культуре составляет до 50% от общего числа клеток. При этом споры *V. cereus* обладают достаточно высокой температурной устойчивостью и могут выживать не только при обычных методах технологической обработки пищи (варка, обжаривание, кипячение), но и при стерилизации молока и консервов.

76. Критериями диагностики заболеваний, вызываемых *V. cereus*, являются: обнаружение *V. cereus* в подозреваемом продукте питания в количестве не менее 10⁵ в 1 г (см³); обнаружение *V. cereus* в кале и рвотных массах или промывных водах желудка в количестве 10²-10³ в 1 г/мл; обнаружение *V. cereus* в кале большинства пострадавших при расследуемой вспышке пищевого отравления; обнаружение *V. cereus* при спорадических заболеваниях в кале пострадавшего только в острый период заболевания с последующим исчезновением к моменту выздоровления.

77. Бактериологические исследования клинического материала.

77.1. Первый день. Готовят исходные и ряд десятикратных разведений материала на ИХН. Производят посев разведений на поверхность солевого полимиксинового агара с 2,3,5-ТТХ или среду Никодемуса. Внесенный в чашки Петри посевной материал равномерно распределяют по поверхности питательной среды при помощи шпателя, после чего инкубируют при температуре 30-37⁰С от 24 до 96 часов. Посев производят согласно приложению 22 к настоящей Инструкции.

77.2. Второй день. Изучают морфологию выросших колоний, микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, подсчитывают типичные колонии. Штаммы *V. cereus* на среде Никодемуса образуют крупные белые распластанные колонии со слегка изрезанными краями, окруженные широкой зоной глубокого белого равномерного матового коагулята или двойной зоной-коагулята и просветления. На солевом полимиксиновом агаре с 2,3,5-ТТХ они образуют ярко рубиновые ко-

лонии на фоне широкой зоны глубокого равномерного белого коагулята; колонии в первые часы роста – округлые, выпуклые, в дальнейшем (24-48 часов) распластанные на поверхности агара с изрезанными краями. Для определения количества *B. cereus*, количество выросших типичных колоний на чашках умножают на соответствующее разведение и выражают в пересчете на 1 г/мл исследуемого материала. Пересевают 3-5 колоний на скошенный агар. Инкубируют при 30-37⁰С 18-24 часа.

77.3. Третий день. Изучают характер роста на скошенном агаре, морфологию выросших культур в окрашенных по Граму препаратах и проверяют чистоту культуры. Проводят микроскопию висячей или раздавленной капли для установления подвижности культуры. *B. cereus* в отличие от *B. anthracis* обладает подвижностью. Культуру засевают на «пестрый ряд», включающий глюкозу и маннит и на кровяной агар. Для доказательства анаэробной ферментации глюкозы культуру со скошенного агара высевают уколом в питательную среду с индикатором бромкрезоловым пурпуровым и глюкозой. Для определения способности ферментировать маннит культуру со скошенного агара пересевают на питательную среду с индикатором бромкрезоловым пурпуровым и маннитом. Посевы инкубируют при 30-37⁰С в течение 24 ч. Культуру со скошенного агара пересевают на глюкозо-пептонный бульон рН 7,0 (для последующей постановки реакции на ацетилметилкарбинол). Посевы инкубируют при 30⁰С в течение 24 ч.

77.4. Четвертый день. Идентификация выделенных культур по «пестрому ряду» и кровяному агару. *B. cereus* ферментирует глюкозу и не ферментирует маннит. Для постановки реакции на ацетилметилкарбинол к 1 мл 24-часовой культуры на глюкозо-пептонном бульоне прибавляется 0,2 мл 40% водного раствора КОН и 0,6 мл раствора α-нафтола (α-нафтола 5 г, абсолютного этилового спирта 100 мл, раствор должен быть свежеприготовленным). Положительная реакция отмечается в виде розового окрашивания через 2-24 часа инкубации при 37+1⁰С. Если при изучении культуральных морфологических и биохимических свойств микроорганизмов обнаружены подвижные, грамположительные, споробразующие палочки, обладающие гемолитической активностью, образующие ацетилметилкарбинол, ферментирующие в анаэробных условиях глюкозу и не способные ферментировать маннит, то дают заключение об обнаружении *B. cereus*.

78. Пищевые продукты. С целью определения количества *B. cereus* в 1 г (см³) исследуемого продукта пробу продукта, или его разведения в объеме 0,1-0,2 см³ высевают поверхностным методом в две чашки Петри с солевым полимиксиновым агаром с 2,3,5-ТТХ. Посевы инкубируют при 30⁰С в течение 24-48 ч. Через 24 ч посевы просматривают и выбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 колоний, характерных для *B. cereus*, характеристика колоний *B. cereus* приведена выше. Через 48 ч уточняют число обнаруженных колоний. Корректировку подсчета количества *B. cereus* проводят после изучения морфологических и биохимических особенностей микроорганизмов из колоний характерных для *B. cereus*. Подтверждают принадлежность характерных колоний к *B. cereus*. Для этого микроорганизмы из 5 колоний пересевают на скошенный мясо-пептонный агар и термостатируют при 30⁰С в течение 18-24 ч. Идентификацию проводят по тестам, описанным выше при исследовании клинического материала.

При подсчете *V.cereus*, если в 80 % случаях, т.е. не менее чем в 4 из 5 колоний подтвержден рост *V. cereus*, то считают, что все характерные колонии, выросшие в чашке принадлежат к *V. cereus*. В остальных случаях количество *V. cereus* определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для изучения морфологических и биохимических свойств. Результаты испытаний пересчитывают на 1 г (см³) продукта. При исследовании на *V.cereus* возможно применение других питательных сред, применяемых при индикации данного микроорганизма, по ГОСТ 10444.8-88 «Продукты пищевые. Метод определения *V.cereus*».

ГЛАВА 9 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

79. Бактерии рода *Staphylococcus* широко распространены в природе. Представлены неподвижными клетками диаметром 0,5-1,5 мкм. В мазках расположены одиночно, парами или виноградными гроздьями. Основные дифференциальные признаки стафилококков – характерная морфология и положительная окраска по Граму. Температурный оптимум 30-37°C. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладающие дыхательным и бродильным типами метаболизма. На плотных питательных средах колонии обычно не прозрачные, белые или кремовые, иногда от желтых до оранжевых. Каталазоположительные, содержат цитохромы, но обычно оксидазоотрицательные. Проявляют высокую биохимическую активность: восстанавливают нитраты, вырабатывают H₂S, разлагают мочевину и ферментируют многие углеводы с образованием кислоты.

80. Стафилококки хорошо переносят высушивание, сохраняя вирулентность. Погибают при прямом воздействии солнечного света в течение 10-12 часов, устойчивы к нагреванию – при 70-80°C погибают за 20-30 мин, при 150°C за 10 мин, сухой жар убивает их за 2 часа. Стафилококки очень устойчивы по отношению к находящемуся в продуктах хлористому натрию, при концентрации NaCl равной 7-10% еще наблюдается их размножение. Сахар не препятствует размножению стафилококков, концентрация его более 60% является задерживающим фактором их роста.

81. Одним из факторов патогенности стафилококков является наличие фермента коагулазы. По наличию коагулазы все стафилококки разделяют на две группы: коагулазоположительные и коагулазоотрицательные. Среди коагулазоположительных стафилококков поражение у человека вызывает *S.aureus* (золотистый стафилококк), который чаще всего может быть причиной пищевого отравления. Факторами патогенности стафилококков, являются энтеротоксины А, В, С₁₋₂, Д, Е – термостабильные низкомолекулярные белки. Основные продуценты бактерии III фагогруппы. Именно эти токсины ответственны за развитие пищевых отравлений. Наиболее часто регистрируют интоксикации, вызванные энтеротоксинами А и Д. Энтеротоксины выдерживают автоклавирование при 120°C в течение 20 минут. Снижение терморезистентности энтеротоксина связано с рН среды. Так, при рН 4,5, нагревание на кипящей бане в течение 40 минут снижает активность энтеротоксина в 10 раз, а при рН 3,0 энтеротоксин полностью разрушается.

82. Стафилококковые пищевые отравления проявляются рвотой, болями в животе и водянистой диареей, уже через 2-6 часов после употребления в пищу контаминированных продуктов. Любой вид пищевого продукта может быть причиной этих отравлений, обычно это кондитерские изделия с кремом, мясные и овощные салаты. Стафилококковые отравления часто связаны с консервами (овощными, мясными, рыбными), в них стафилококки обычно попадают с контаминированным сырьем или растительным маслом. При наличии стафилококка в количестве 10^6 и более в 1г продукта энтеротоксин накапливается за 4-8ч, причем без внешних изменений банок.

83. Критерии диагностики. Для оценки результатов исследования на стафилококки при пищевых отравлениях имеет значение количественное обсеменение (10^5 - 10^6 г (см^3)) пищевых продуктов; обнаружение возбудителя в рвотных массах, промывных водах, испражнениях. При обнаружении возбудителя в пищевых продуктах количественный учет является косвенным показателем наличия энтеротоксина.

84. Бактериологические исследования клинического материала.

84.1. Первый день. Рвотные массы, промывные воды, испражнения, высевают в количестве 2 капель на поверхность молочно-солевого или желточно-солевого агара (далее - ЖСА). Посевной материал равномерно распределяют по поверхности агара стерильным шпателем и втирают досуха. Посевы инкубируют при $37+1^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов.

84.2. На второй день просматривают посевы на чашках с молочно-солевым агаром и ЖСА. На молочно-солевом агаре колонии *S.aureus* круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара, с ровными краями, диаметром 2-2,5 мм, окрашены в желтый, золотистый, лимонно-желтый, кремовый, палевый или белый цвет. На ЖСА колонии окружены зоной лецитиназной активности (золотистый стафилококк в 60-70% случаев обладает лецитиназной активностью). Для накопления культуры на скошенный агар отсевают не менее 2-х колоний, подозрительных на стафилококк, и, прежде всего, колонии, дающие положительную лецитовителлазную реакцию. Посевы инкубируют при $37+1^\circ\text{C}$ 18-24 ч.

84.3. Третий день. У выделенных штаммов проверяют морфологические и тинкториальные свойства (окраска по Граму) и наличие плазмокоагулирующей активности. При микроскопии, окрашенные по Граму стафилококки имеют вид фиолетово-синих кокков, располагающихся гроздьями или небольшими скоплениями («кружево»).

Плазмокоагулирующую активность определяют в реакции коагуляции плазмы (далее - РКП). Реакция плазмокоагуляции ставится в соответствии с «Инструкцией по применению плазмы кроличьей цитратной сухой», выпускаемой предприятиями по производству бактериальных препаратов. С учетом результатов РКП и лецитовителлазной активности, может быть подтверждена принадлежность выделенного штамма к виду золотистого стафилококка. Если культура обладает только плазмокоагулирующей или только лецитовителлазной активностью, то для окончательного ответа требуется определение ферментации маннита в анаэробных условиях. Ответ выдают в зависимости от результатов, полученных при определении признаков согласно приложению 23 к настоящей Инструкции.

Тест ферментации маннита в анаэробных условиях. Суточную агаровую культуру засевают уколом в столбик полужидкой среды Гисса с маннитом, на поверхность среды наливают 1,5 мл стерильного вазелинового масла для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$, в течение 5 суток, ежедневно просматривают и ведут учет. Положительной считается реакция изменения цвета среды. Количественный учет стафилококков выросших при посеве клинического материала не проводят.

85. Пищевые продукты.

85.1. Количество *S.aureus* в 1 г (см^3) продукта определяют методом посева на агаризованные селективно-диагностические среды. Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений. 0,1 или 0,2 см^3 продукта, или его разведения наносят на поверхность одной из селективно-диагностических сред (Байрд-Паркер агар, молочно-солевой агар, желточно-солевой агар). Преимущественно используют Байрд-Паркер агар. Для посева продукта или каждого его разведения используют две параллельные чашки Петри со средой. Одновременно производят посев навески продукта или его эквивалентного разведения в среды обогащения (6,0 % солевой бульон и 1 % сахарный бульон). Соотношение между количеством высеваемого продукта или его эквивалентным разведением и питательной средой 1:6 или 1:7. При анализе пищевых продуктов с большим содержанием соли проводят посев продукта или его разведения в сахарный бульон, во всех других случаях для посева используют солевой бульон. Посевы на агаризованных и жидких средах инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч.

85.2. Для подтверждения роста микроорганизмов в жидких средах из них после инкубирования делают пересевы на поверхность одной из селективно-диагностических сред (Байрд-Паркер агар, молочно-солевой агар, желточно-солевой агар). Посевы инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 ч. Просматривают посевы на агаризованных средах и отмечают характер роста. На Байрд-Паркер агаре колонии *S.aureus* выглядят черными, блестящими, 1,5-2,5 мм в диаметре, окружены зоной лецитиназной активности. Для подсчета количества выросших колоний отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Отмечают рост характерных колоний, отсеянных со сред обогащения, без подсчета их количества.

85.3. Для подтверждения принадлежности характерных колоний к *S.aureus* отбирают не менее 5 колоний и пересевают на поверхность скошенной питательной среды (мясо-пептонного агара). Посевы инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. У выросших микроорганизмов определяют отношение к окраске по Граму, плазмокоагулирующую активность, ферментацию маннита в анаэробных условиях. Для определения *S.aureus* в 1 г (см^3) продукта подсчет числа характерных колоний подлежит корректировке, в зависимости от результатов подтверждения принадлежности этих колоний к *S.aureus*. При подтверждении характерных колоний в 80 % случаев, т.е. не менее чем в 4 из 5 колоний подтвержден рост *S.aureus*, то считают, что все характерные колонии принадлежат к *S.aureus*. В остальных случаях количество *S.aureus* определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для подтверждения. Пересчитывают количество *S. aureus* на 1 г (см^3) продукта.

86. Биологические исследования. Биологические исследования производят: для изучения способности выделенных стафилококков образовывать энтеротоксин на питательных средах и для выявления наличия стафилококкового энтеротоксина в продукте. В качестве экспериментальных животных могут быть использованы котята (1,5-2-месячные) и взрослые кошки.

86.1. Биопроба на котятах. Исследуемый продукт или пятисуточную молочную культуру выделенного стафилококка (15-20 мл) скармливают котятам натошак. Если котята не едят данный продукт, следует приготовить взвесь продукта в дистиллированной воде (1:1), хорошо гомогенизировать и спойть его по 15-20 мл каждому котенку при помощи пипетки или ложки. В опыте должно быть 2-3 котенка. Положительной реакцией считают рвоту, наступившую через 30-60 минут, иногда наблюдается понос и общая протрация. Рвота, появляющаяся через 5-10 минут, неспецифична. Наблюдение за котятами ведут в течение 4-5 часов. Если за этот период котята не реагируют, биологическая проба считается отрицательной.

86.2. Биопроба на кошках. Энтеротоксичность определяют путем внутривенного введения материала взрослым кошкам. Этот метод достаточно чувствителен. Недостатком метода является ограниченность его применения для обнаружения энтеротоксина непосредственно в продуктах. Для обнаружения энтеротоксичности культур пользуются 0,75% агаром на бульоне Хоттингера с 0,25% глюкозы рН 7,4. Чашки, засеянные культурами стафилококков, помещают в эксикатор с 20% углекислотой и инкубируют 48 часов при $37+1^{\circ}\text{C}$. Чтобы получить в эксикаторе 20% углекислоты, насыпают на дно двууглекислую соду из расчета 1 г соды на каждый литр объема эксикатора, загружают его чашками и, немного приоткрыв крышку, наливают 10% соляную кислоту непосредственно на соду (на 1 г соды – 8-9 мл кислоты). После добавления кислоты крышку эксикатора быстро закрывают и притирают. После инкубации чашки вынимают и на поверхность агара наливают 10 мл физиологического раствора, агар измельчают до равномерной кашицеобразной консистенции и оставляют при комнатной температуре на 2 часа. Экстракт центрифугируют до получения прозрачного слоя, который отсасывают, прогревают в кипящей водяной бане в течение 30 минут и вводят кошкам в количестве 0,5 мл на 1 кг веса тела в вену уха или бедренную вену. Наличие рвоты и поноса или только рвоты, наступившей в сроки от 30 минут до 3 часов указывает на присутствие энтеротоксина. Каждую кошку можно использовать для этих целей 3-4 раза. При получении отрицательных результатов у кошки, которая ранее была использована для аналогичных определений, необходима проверка на кошке, не бывшей в опыте. При помощи метода внутривенного введения кошкам решать вопрос о наличии энтеротоксина в пищевом продукте нужно с большой осторожностью. Из продукта, исследуемого на наличие энтеротоксина, готовят взвесь в стерильном физиологическом растворе таким образом, чтобы при последующем центрифугировании получить достаточное количество надосадочной жидкости для постановки биологической пробы. В качестве контроля необходимо получить отрицательный результат у кошки, предназначенной для опыта, при введении надосадочной жидкости, полученной из доброкачественного тождественного продукта, подготовленного тем же способом, что и опытный образец.

87. В качестве альтернативы биологическому методу обнаружения стафилококкового энтеротоксина возможно применение метода ИФА.

ГЛАВА 10 ENTEROCOCCUS

88. Энтерококки – условно-патогенные бактерии рода *Enterococcus*. *E. faecalis* и *E. faecium* чаще других являются этиологическими факторами пищевых отравлений.

89. Энтерококки – овальные или сферические бактерии размером 0,6-2,0 x 0,6-2,5 мкм. В мазках из жидких сред располагаются парами или в виде коротких и длинных цепочек, из плотных - в виде диплококков или скоплений кокков, грамположительны. Спор и капсул не образуют. Как правило, не подвижны, иногда подвижны за счет 1-4 жгутиков. Резко полиморфны. Полиморфизм особенно выражен у культур, выделенных из пищевых продуктов. Факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, метаболизм бродильного типа, каталазоотрицательные.

90. По антигенному строению энтерококки составляют однородную группу, обозначаемую по серологической классификации Лансфилд буквой D. У *E. faecalis* отмечено наличие видового антигена, который по своей химической природе является термоустойчивым полисахаридом.

91. Энтерококки довольно медленно растут на обычных питательных средах, для более интенсивного роста в среды добавляют углеводы (глюкозу, лактозу), многоатомный спирт – маннит, дрожжевые препараты (автолизаты, диализаты, экстракты), аминокислоты (агринин, аланин и др.), витамины (рибофлавин, никотиновая кислота и др.). Энтерококки хорошо растут на кровяном и шоколадном агаре. На плотных питательных средах энтерококки образуют мелкие круглые колонии. При росте в жидких средах они вызывают их диффузное помутнение и образование аморфного осадка. Критерии Шермена – признаки четко дифференцирующие энтерококки от стрептококков. Они растут при температуре от 10⁰С до 50⁰С (оптимальная температура 37⁰С), при рН 9,6, концентрации NaCl 6,5 % и желчи – 40 %, растут в молоке с 0,1% метиленового синего (обесцвечивание). Основные виды энтерококков вызывающих пищевые отравления, отличаются по ряду признаков, согласно приложению 24 к настоящей Инструкции.

92. Свежевыделенные из любого источника штаммы энтерококков, обладающие протеолитическими свойствами, проявляют свои энтеропатогенные свойства, если попадают в организм людей в количествах, составляющих 10⁶ и более живых клеток в 1 г (см³) продукта.

93. Энтерококки являются облигатными представителями нормальной микрофлоры кишечника человека и теплокровных животных (у здоровых людей количество энтерококка в 1 г испражнений колеблется в пределах 10⁴-10⁹) в связи с чем они широко распространены во внешней среде, в различных пищевых продуктах, но особенно часто их обнаруживают в молочных продуктах. Органолептика продуктов зависит от вида энтерококка, обсеменяющего продукт. Так, штаммы *E. faecium* не изменяют органолептику мясных продуктов, а молоко свертывают и придают ему приятный вкус кисломолочного продукта. Штаммы энтерококков, которые могут вызывать пищевые отравления, придают продуктам неприятный горький вкус и ослизнение, но органолептические изменения в продук-

тах наступают, когда в них содержится более чем 10^6 клеток энтерококков в 1 г (см^3). Протеолитические варианты *E. faecalis* могут вызывать пищевые отравления, симптомами которых являются жидкий стул до 3-5 раз в сутки, боли в животе при нормальной температуре тела.

94. При лабораторной диагностике энтерококковых пищевых отравлений исследованию следует подвергать продукты, заподозренные как факторы передачи, испражнения, рвотные массы и промывные воды желудка.

95. Критерии диагностики. Диагноз энтерококкового пищевого отравления подтверждается, если в продукте и кале больных были обнаружены протеолитические штаммы энтерококков в количествах более чем 10^6 в 1 г (см^3) продукта и более чем 10^4 в 1 г кала при наличии клинических симптомов заболевания.

96. Бактериологические исследования клинического материала.

96.1. Первый день. Рвотные массы и промывные воды желудка перед посевом нейтрализуют 10% раствором NaHCO_3 до pH 7,2-7,4. Испражнения суспендируют в ИХН 1:10, затем готовят десятикратные разведения до 10^{-5} на 0,1% пептонной воде. Из каждого разведения берут по 0,1 мл и высевают на энтерококковую дифференциально-диагностическую среду (далее - ЭДДС). Высеянный материал тщательно втирают шпателем в поверхность среды. Посевы инкубируют при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов.

96.2. Второй день. Через 18-24 часа посевы просматривают, обращают внимание на количественную обсемененность и видовую принадлежность выделенных энтерококков. На среде ЭДДС все энтерококки растут хорошо, гемолитически активные штаммы образуют вокруг колоний белые зоны, соответствующие цвету молочного агара, или зоны позеленения среды, у протеолитически активных штаммов появляются четко выраженные темно-красные или бурые зоны вокруг колоний, при наличии обоих (гемолитического и протеолитического) фермента среда вокруг колоний просветляется, приобретая вид обычного питательного агара, штаммы энтерококков не продуцирующих этих ферментов цвет не изменяют. Учитывают способность исследуемых культур к редукции 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). *E. faecalis* растут в виде вишнево-красных колоний с белыми ободками, колонии *E. faecium* бесцветны, или окрашены в слабо-розовый цвет. Подвижные формы энтерококков, обладая слабой редуцирующей активностью, образуют карликовые колонии розовых оттенков разной интенсивности. 3-5 колоний отсевают на скошенный агар для дальнейшей идентификации. На скошенном агаре посевы культивируют при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов.

96.3. Третий день. Из роста на скошенном агаре готовят мазки и красят их по Граму. Определяют каталазную активность штаммов. Грамположительные, каталазоотрицательные диплококки подвергают дальнейшему изучению. Культуры высевают на желчно-щелочной агар (далее - ЖЩА), сахарно-дрожжевой агар с теллуридом калия, в столбик 0,2 % агара. Окончательно учитывают протеолитическую активность. Подсчитывают все типичные колонии и число их пересчитывают на 1 г/мл исследуемого материала.

96.4. Четвертый день. Учитывают результаты третьего дня. Рост культуры на ЖЩА подтверждает ее принадлежность к энтерококкам. На сахарно-дрожжевом агаре с теллуридом калия растут только штаммы вида *E. faecalis*,

устойчивые к высоким концентрациям теллурита калия. В процессе роста они восстанавливают теллурит калия, образуя при этом черные колонии, окруженные узким бесцветным ободком. В полужидком (0,2 %) агаре, засеянном уколом, подвижные формы энтерококков вызывают диффузное помутнение всего столбика среды, неподвижные виды растут только по ходу укола.

97. Пищевые продукты. Для определения количества энтерококков, 0,1 или 0,2 см³ продукта или его разведения, высевают на поверхность питательной среды (ЭДДС, канамицин-эскулин-азидный агар и др.). Посевы инкубируют при 37+1⁰С через 24 ч проводят предварительный, через 48 ч окончательный учет результатов. На канамицин-эскулин-азидном агаре колонии энтерококков оливково-зеленые, до темно-коричнево-черных, с равномерной окраской поля. Учитывают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. 3-5 колоний отсевают на скошенный агар для дальнейшей идентификации, посевы культивируют при 37+1⁰С в течение 24 часов. Из роста на скошенном агаре готовят мазки и красят их по Граму. Определяют каталазную активность штаммов. Дальнейшую идентификацию проводят, как описано выше. Если при подтверждении характерных колоний в 80% случаев, т.е. не менее чем в 4 из 5 колоний подтвержден рост энтерококков, то считают, что все колонии принадлежат к энтерококкам. В остальных случаях количество энтерококков определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству колоний, взятых для подтверждения. Результаты пересчитывают на 1 г (см³) продукта.

ГЛАВА 11

CLOSTRIDIUM BOTULINUM

98. *Clostridium botulinum* – вид бактерий рода *Clostridium*, вызывает ботулизм – тяжелое пищевое бактериальное отравление с преимущественным поражением центральной нервной системы и высокой летальностью. Проявления заболевания зависят от количества токсина, поступившего в организм и состояния больного. Временной интервал между попаданием токсина в организм и появлением первых признаков ботулизма, обычно не превышает 24 ч, но может варьировать от 4-6 до 96 часов и более. Ботулизм связан, главным образом, с продуктами домашнего приготовления, заготовленными впрок. Общепринятые в домашних условиях способы обработки пищевых продуктов, такие как консервирование в банках, копчение, маринование, соление и др., не приводят к уничтожению возбудителей ботулизма и их спор и при длительном хранении в этих продуктах может образоваться токсин.

99. Возбудители ботулизма широко распространены в природе, нормальные обитатели кишечника животных и человека, попадают в почву с фекалиями. Естественный резервуар-почва. Широкое распространение возбудителей ботулизма в почве ведет к попаданию этих микробов на овощи и фрукты, а также к обсеменению сырья, идущего для приготовления консервов, колбас и других продуктов.

100. Серологическая идентификация *C. botulinum* основана на выявлении экзотоксинов. В зависимости от антигенных свойств, которые разделяют на 7 сероваров: А, В, С, D, Е, F, G. Оптимальная температура для токсинообразования переменна: для бактерий типов А, В, С, D - 35⁰С, для типов Е и F - 28- 30⁰С.

Патогенность *C. botulinum* для разных теплокровных различна. Заболевания у человека вызывают бактерии типов А, В, Е, F; бактерии типов С, D вызывают заболевания животных и птиц (в редких случаях от больных животных выделяют бактерии типов А и В). Патогенность типа G для человека и животных не доказана. Главные факторы патогенности *C. botulinum* – экзотоксины, оказывают нейротоксическое действие на организм, в организме возбудитель практически не размножается. Ботулинические токсины довольно устойчивы к температурным воздействиям. Токсин иногда разрушается только при кипячении в течение 10-15 минут и не разрушается в желудочно-кишечном тракте под влиянием пищеварительных ферментов. Ботулинический токсин – самый сильный из всех биологических ядов. *C. botulinum* типов А, В, С, D, Е, F – очень близки по морфологии, культуральным свойствам и по действию их токсинов на организм человека и животных. Все они дают одинаковую клиническую картину болезни. Различные типы ботулинического микроба отличаются по антигенным свойствам вырабатываемых ими токсинов, токсин каждого типа нейтрализуется сывороткой того же типа.

101. По морфологии возбудители ботулизма представляют собой небольшие палочки 0,6-1,0 x 3,0-9,0 мкм с закругленными концами. Палочки образуют субтерминальные или терминальные споры, палочки со спорой имеют вид теннисной ракетки, легко окрашиваются различными анилиновыми красками, молодые клетки грамположительны, при старении культуры (через 4-5 суток роста) палочки окрашиваются грамотрицательно, микробы подвижны, имеют от 4 до 35 жгутиков, капсул не образуют.

102. Возбудители ботулизма - строгие анаэробы, они растут без доступа воздуха, поэтому обычно размножаются и образуют токсин внутри больших кусков рыбы, ветчины, колбасы, либо в герметически закрытых банках консервов. Возбудители ботулизма типа Е, а также непротеолитические штаммы типа В и некоторые штаммы типа F образуют на питательных средах и в пищевых продуктах кроме токсина и нетоксичный предшественник токсина - протоксин, который, не убивая мышей при парентеральном введении, проявляет свою биологическую активность при попадании в желудочно-кишечный тракт человека и животных в результате воздействия на него протеолитических ферментов. При добавлении протеолитических ферментов (трипсина, панкреатина) *in vitro* также происходит активация протоксина, который переходит в токсин. Этот феномен следует учитывать при проведении лабораторной диагностики ботулизма. Нередко консервные банки, куда вместе с продуктами попадает и возбудитель ботулизма, оказываются бомбажными за счет образования микробом газа, однако, часто при наличии микробов ботулизма и ботулинических токсинов пищевые продукты выглядят совершенно доброкачественными и консервные банки не дают «бомбажа». Иногда отмечается специфический запах прогорклого масла.

103. Критерии диагностики. Лабораторная диагностика ботулизма преследует цель обнаружения и идентификации ботулинического токсина и выделение возбудителя. Лабораторному исследованию подлежат остатки пищевых продуктов, материал, полученный от больного (кровь, испражнения, моча, промывные воды желудка, рвотные массы) и секционный материал. Кровь берут из вены пациента в количестве 15-20 мл, промывные воды желудка забирают в объеме 50-

100 мл, кал 50-60 г. На секции забирают кусочки печени (50-60 г), отрезки кишечника и желудка и их содержимое. До поступления в лабораторию образцы хранят на холоде. Кровь исследуют только на наличие токсина (для чего проводят биологическую пробу), испражнения только на наличие возбудителя (проводят посев на питательные среды), весь остальной материал на наличие возбудителя и его токсина.

104. Бактериологические исследования.

104.1. Обнаружение и идентификация токсина.

Первый день. Пробы исследуют одновременно по двум направлениям: производят обнаружение ботулинических токсинов и ботулинических микробов. Две трети предварительно подготовленной пробы используют для обнаружения ботулинических токсинов, одну треть – для посевов с целью обнаружения ботулинических микробов.

Часть пробы, которую исследуют на наличие токсинов, выдерживают в течение 1-1,5 часов при комнатной температуре для экстрагирования токсинов, фильтруют через ватно-марлевый фильтр или центрифугируют при 2500-3000 об/мин, в течение 15-20 минут.

Для обнаружения ботулинических токсинов с полученными фильтрами или надосадочной жидкостью ставят реакцию нейтрализации токсина антитоксической сывороткой и реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) с диагностиком эритроцитарным ботулиническим поливалентным типов АВЕ иммуноглобулиновым сухим и диагностиком эритроцитарным ботулиническим моноспецифическим А, В и Е иммуноглобулиновым сухим.

Обнаружение ботулинических токсинов в реакции нейтрализации.

Для обнаружения токсинов следует взять для каждой пробы 4-х мышей весом 16-18 грамм. В связи с тем, что в исследуемом материале может быть один или несколько типов ботулинических токсинов, предварительную реакцию необходимо ставить со смесью противоботулинических диагностических сывороток типа А, В, С, Е, F. С этой целью выпускаются сухие типоспецифические диагностические сыворотки, титр которых должен быть в пределах: для типа А – 200-400 МЕ; для типа В – 100-200 МЕ; для типа С – 200-300 МЕ; для типа Е – 200-400 МЕ; для типа F – 50-100 МЕ.

Доза сыворотки, которую рекомендуют для реакции нейтрализации, как правило, обеспечивает нейтрализацию гомологичного токсина в исследуемой пробе, ибо в организме и выделениях больных, а также в экстрактах из пищевых продуктов, очень сильные токсины почти не встречаются. Нельзя пользоваться для целей диагностики лечебными противоботулиническими сыворотками.

Для постановки реакции нейтрализации готовят смесь из равных объемов моновалентных сывороток типов А, В, С, Е, F. Типовой протокол развернутой реакции нейтрализации согласно приложению 25 к настоящей Инструкции. Из каждой исследуемой пробы наливают в две пробирки равное количество (1,5-2,4 мл) фильтра или надосадочной жидкости. Остаток сохраняют в холодильнике для дальнейших исследований. В одну пробирку (контроль) добавляют 0,6 мл физиологического раствора, в другую (опыт) – 0,6 мл смеси моновалентных сывороток. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 минут, после чего содержимое каждой пробирки вводят в объеме

0,7-1,0 мл двум белым мышам. Исследуемый материал из каждой пробирки следует вводить разными шприцами или сначала контроль, а затем опыт.

Наблюдение за животными проводят в течение 4-х дней, однако, если мыши болеют или погибают раньше этого срока, то тут же ставят реакцию нейтрализации с моновалентными сыворотками. Ботулинический токсин не дает молниеносной гибели животных (в течение нескольких минут или секунд), мыши погибают не ранее, чем через 4-5 часов. При наличии ботулинического токсина погибают две мыши контрольные, которым вводили несмешанный с сыворотками фильтрат, опытные мыши остаются живы. Обычно картина болезни и гибели мышей очень характерна: появляется учащенное дыхание, состояние полного расслабления мышц, западение брюшной стенки («осиная талия»), параличи и судороги перед смертью.

В случае гибели всех 4-х мышей, т.е. тех, которым был введен фильтрат без сыворотки и с сывороткой, следует повторить реакцию нейтрализации с экстрактами, разведенными в 5, 10, 20 и даже 100 раз. При разведении экстрактов посторонняя микрофлора теряет способность убивать мышей, а ботулинические токсины, обладая обычно большей биологической активностью, будут вызывать гибель мышей даже при разведении фильтров (экстрактов).

Вместо мышей для реакции нейтрализации могут быть использованы морские свинки весом 250-300 г. Одной из них вводят подкожно или внутрибрюшинно 0,5 мл смеси сывороток А, В, С, Е, F и 3 мл испытуемого фильтрата (или надосадочной жидкости), контрольной свинке вводят 3 мл испытуемого материала.

В случае обнаружения в пробе ботулинического токсина сразу же ставят развернутую реакцию нейтрализации для определения типа токсина с типоспецифическими диагностическими сыворотками.

В 6 пробирок разливают по 2,4 мл исследуемого фильтрата, затем в каждую пробирку добавляют по 0,6 мл сыворотки: в первую пробирку сыворотку типа А, во вторую – типа В, в третью – типа С, в четвертую – типа Е, в пятую – типа F, в шестую приливают 0,6 мл физиологического раствора. Все сыворотки наливают разными пипетками. Смесь после 30 минут выдерживания при комнатной температуре вводят внутривенно или внутрибрюшинно по 1 мл двум мышам из каждой пробирки отдельными шприцами, типовой протокол развернутой реакции нейтрализации согласно приложению 25 к настоящей Инструкции.

Учет результатов проводится через 4-6 часов, 24 часа и далее на протяжении 4-х дней. При наличии ботулинического токсина выживают мыши, получившие смесь токсина и гомологичной сыворотки, при гибели всех остальных мышей. Тип сыворотки, нейтрализующей токсин, указывает на типовую принадлежность токсина.

Например, если гибнут все мыши, кроме тех, которым введено содержимое пробирки № 1, то в исследуемом материале будет установлен токсин типа А.

Особое внимание нужно обратить на постановку реакции нейтрализации с сывороткой больного, так как ее обычно бывает мало. Следует сразу поставить развернутую реакцию нейтрализации с моновалентными ботулиническими сыворотками только типов А, В, Е, т.к. остальные типы ботулинических палочек встречаются очень редко. Для этого в три пробирки поровну разливают всю сы-

воротку больного, а затем в первую пробирку добавляют диагностическую сыворотку типа А – 0,4 мл, во вторую – типа В, в третью – типа Е. Все содержимое каждой пробирки вводят поровну двум мышам. Например, если в каждую пробирку налили по 1,8 мл сыворотки больного, а затем по 0,4 мл диагностической сыворотки, всего в пробирке будет 2,2 мл смеси. Эту смесь вводят внутривенно или внутривентрально мышам по 1 мл (0,2 мл останется на стенках пробирки). Выжившие мыши укажут на тип токсина в крови больного, контролем будут павшие мыши, которым была введена сыворотка больного в смеси с диагностической ботулинической сывороткой других типов.

При получении положительной реакции нейтрализации с диагностическими ботулиническими сыворотками дают заключение о наличии в исследуемом материале ботулинического токсина и указывают его тип.

Нередко постановку реакции нейтрализации, как с поливалентной, так и с моновалентной сыворотками приходится повторять из-за неспецифической токсичности посторонней микрофлоры, которая обычно имеется в рвотных массах, кале, органах трупов, поэтому в лучшем случае ответ о наличии токсина в пробе может быть дан на 2-3 день, а о его типовой принадлежности на 3-5 день от начала исследования.

В настоящее время установлено, что противоботулиническая сыворотка типа Е нейтрализует также ботулинический токсин типа F и наоборот. Поэтому при получении положительной реакции нейтрализации одновременно с противоботулиническими сыворотками типа Е и F следует провести дифференциальную диагностику: необходимо определить, относится ли обнаруженный токсин к типу Е или к типу F. Для этого следует поставить реакцию нейтрализации на мышах параллельно с двумя противоботулиническими диагностическими сыворотками типа Е и типа F, разведенными до концентрации 1 МЕ/мл. Удобнее всего для этих целей использовать стандартные противоботулинические сыворотки, выпускаемые ГКИ им. Тарасевича. Для этого в три пробирки наливают по 2,4 мл испытуемого экстракта, а затем в первую пробирку наливают 0,6 мл диагностической сыворотки типа Е, во вторую – 0,6 мл типа F, разведенных до концентрации 1 МЕ/мл, в третью – контрольную – 0,6 мл физиологического раствора. Если мыши погибают только в контроле и с сывороткой типа Е, то в экстракте имеется токсин типа F. Если наряду с контролем погибают мыши, которым введена смесь с сывороткой типа F, а выживают только мыши с сывороткой типа Е, то в экстракте токсин типа Е.

Обнаружение ботулинических токсинов в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА).

Реакция пассивной гемагглютинации (микрометодом) позволяет получить ответ о содержании ботулинических токсинов в воде, воздухе, смывах, продуктах питания, фураже, силосе и т.д. через 3-4 часа. При этом используются диагностикумы эритроцитарные ботулинические моноспецифические типов А, В и Е и поливалентные типов АВЕ иммуноглобулиновые сухие. Эритроцитарные диагностикумы (ЭД) представляют собой лиофилизированные в объеме 1 мл 3 % взвеси эритроцитов барана, сенсibilизированные антителами (иммуноглобулины класса G) к ботулиническим токсинам типов А, В или Е. Постановка РПГА согласно инструкции по применению.

104.2. Обнаружение возбудителей ботулизма.

Первый день. Для обнаружения возбудителей ботулизма производят посев 3-5 мл из 1/3 предварительно подготовленного материала на жидкие питательные среды. Для первичных посевов используют печеночно-глицериновую среду, бульон триптиказо-пептонно-глюкозный с дрожжевым экстрактом и трипсином, бульон Хоттингера, среду Китт-Тароцци, среду питательную для контроля стерильности и др. Необходимо, чтобы рН был в пределах 7,2-7,4. Обязательным является наличие в мясных средах мясного или печеночного фарша, а в казеиновых – отварного пшена и ваты. Пробирка или флакон должны быть заполнены питательной средой не менее чем наполовину. Перед посевом среды нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 минут, после чего быстро охлаждают, добавляют 0,5% глюкозы и производят посев.

Посевы необходимо производить в среды в больших пробирках или во флаконах емкостью по 100-200 мл, залитые слоем вазелинового масла толщиной в 0,5 см. Лучше засеивать исходный посевной материал в большой объем среды (70,0-150 мл), чтобы культуральной жидкости первичного посева хватило на все исследования (постановка реакции с поливалентной сывороткой и развернутой реакции нейтрализации, нередко с двух или трехкратным повторением). Последующие пересевы исследуемых проб из первичного посева в те же жидкие питательные среды могут не дать токсинообразования в среде, из-за бурного роста посторонней микрофлоры.

Посев производить в четыре флакона, один из которых прогревают после посева при 60⁰С 15 минут. В этих условиях прогревания обычно погибают аэробы и вегетативные формы анаэробов, но сохраняются споры *S.botulinum* типа Е, которые погибают при 80⁰С; другой флакон прогревают при 80⁰С 20 минут. Два флакона после посева не прогревают. После этого все флаконы помещают в термостат: один непрогретый флакон и флакон, прогретый при 60⁰С, инкубируют при 28⁰С, другой непрогретый флакон и флакон, прогретый при 80⁰, инкубируют при 35⁰С. Первые два флакона исследуют на *S.botulinum*, типов Е и F, вторые два флакона на *S.botulinum* типов А, В, С.

Если в исследуемом материале возбудители ботулизма находятся преимущественно в вегетативной форме, то рост в посевах будет, главным образом, в непрогретых флаконах. В том же случае, если в материале имеются споровые формы, рост будет в прогретых флаконах и в отдельных случаях может сразу привести к выделению чистой культуры из такого посева. Рост *S.botulinum*, характеризуется нередко сильным газообразованием и иногда протеолизом кусочков печени или фарша.

После посева все исходные образцы проб следует хранить на холоде до окончания исследования. Через 48 часов после появления роста посева исследуются на наличие возбудителей ботулизма.

Есть сообщение о том, что для выявления *S.botulinum* типа Е в среду перед посевом следует добавлять трипсин до конечной концентрации 0,1%. В опытах этих исследователей процент выявления *S.botulinum* типа Е из почвы увеличился на среде с трипсином до 74% исследуемых проб, в то время как исследование этих проб на среде без трипсина дало положительный результат лишь в 17% проб.

Так как для таких исследований требуется трипсин в довольно больших количествах, его можно заменить эквивалентным количеством панкреатина. Кроме того, такие среды можно брать в пробирках с объемом среды 15-20 мл. Трипсин следует готовить в виде 1% раствора, стерилизовать путем фильтрации через асбестовые стерилизующие пластины фильтра Зейтца и добавить из расчета 1 мл 1%-го раствора трипсина на 10 мл среды во флаконы, которые будут инкубироваться при 28⁰С. В тот флакон, который предварительно прогревается, трипсин добавить после прогрева.

Второй день.

Через 48 часов от начала роста из всех флаконов с соблюдением стерильности берут пробы культуральной жидкости (по 10-15 мл) и подвергают их исследованию. Предварительно готовят мазки, красят их по Граму и микроскопируют.

С культуральной жидкостью ставят реакцию нейтрализации с поливалентной противоботулинической сывороткой типов А, В, С, Е, F, как это описано для определения токсинов. При получении положительных результатов реакцию нейтрализации ставят с каждой сывороткой отдельно.

При обнаружении в исследуемом посеве палочек, типичных по морфологии для *C.botulinum*, а также ботулинического токсина дают заключение о зараженности исследуемого материала возбудителем ботулизма и наличии в нем ботулотоксина. Выделение чистой культуры в таком случае не является обязательным.

Если в посевах обнаруживают микробы, по морфологии сходные с *C.botulinum*, а токсин отсутствует, то следует перед постановкой реакции нейтрализации провести активацию культуральной жидкости панкреатином или трипсином для обнаружения ботулинических токсинов типа Е, непротеолитических штаммов типа В и некоторых штаммов типа F, а также провести выделение и изучение чистых культур. Активацию культуральной жидкости перед постановкой реакции нейтрализации с противоботулиническими сыворотками проводят только в том случае, если в среду перед посевом не был добавлен трипсин или панкреатин, как это рекомендовано выше.

Если через двое суток во флаконах не обнаружен рост, то необходимо продолжить инкубацию посевов в термостате, а исследование провести вновь на 4-6-10 сутки. Если исследования, проведенные на 10 сутки, не дали положительных результатов по обнаружению возбудителей ботулизма и их токсинов, то выдают ответ об отсутствии ботулинических палочек и их токсинов в исследуемых материалах.

Посев в высокий столбик агара. Для выделения чистых культур ботулинических палочек применяют 1-1,5% агар с глюкозой, приготовленный на бульоне Мартена или бульоне Хоттингера, разлитый в пробирки диаметром 0,8 см и длиной 15-18 см. Перед посевом агар расплавляют и охлаждают до 45-50⁰С. Посев на высокий столбик производят следующим образом: не отламывая конца пастеровской пипетки, погружают ее в исследуемый материал (чаще это первичный посев материала исследуемого) и переносят последовательно из пробирки в пробирку, тщательно перемешивая, после чего агар перемешивается еще раз путем перекачивания пробирок между двумя ладонями. Охлажденные пробирки с посевом помещаются в термостат при температуре 35-37⁰С. На каждый посев следует брать 5-8 пробирок столбика агара. Если в первичном посеve имеется массивный

рост посторонней микрофлоры и мало типичных ботулинических палочек со спорами, необходимо взять 5-10 мл культуры в пробирку и подвергнуть ее прогреванию на водяной бане при 80°C 20 минут. После этого культуру надо снова посеять на высокий столбик агара.

Через 1-2 суток в последних пробирках появляются отдельные колонии в виде комочков ваты, пушинок с уплотненным центром или же правильных дисков, чечевичек. Подозрительные колонии пересевают на жидкую или полужидкую питательную среду в пробирках с 0,5% глюкозы под слоем вазелинового масла. Одновременно оставшуюся часть колонии микроскопируют.

Пересев колоний из пробирок можно производить двумя способами: столбик агара прокалывают сверху отломанным капилляром пастеровской пипетки и извлекают нужную колонию; дно пробирки с высоким столбиком агара слегка подогревают на пламени горелки; под действием паров закипевшей жидкости агар выталкивается в стерильную чашку Петри. Подозрительную колонию извлекают отломанным капилляром пастеровской пипетки.

Культуру, выросшую из колонии в жидкой среде, микроскопируют и проверяют на наличие токсина с помощью реакции нейтрализации на мышах.

Посев на чашки. Каплю исследуемой жидкости наносят на поверхность сахарно-кровоного или печеночного агара, разлитого толстым слоем (приблизительно 3-5 мм) в чашки Петри. Затем каплю шпателем слегка втирают в агар и последовательно переносят шпатель еще на 2-3 чашки. Чашки помещаются в микроанаэроостат крышкой кверху и выращивают при температуре 35-37°C.

С целью поддержания достаточного вакуума на дно анаэроостата ставится открытая чашка Петри со щелочным раствором пирогаллола. Через сутки колонии ботулинического микроба выглядят в виде прозрачных росинок дымчатого цвета, диаметром 0,1-0,2 см, окруженные зоной гемолиза. Ввиду того, что при большом загрязнении исследуемых проб посторонней микрофлорой возникают трудности в выделении *S.botulinum* особенно типа Е из-за того, что чувствительность спор этого микроба к нагреванию не отличается от чувствительности вегетативных форм некоторых микробов, рекомендуется простой метод выделения чистой культуры микроба, основанный на устойчивости спор палочки ботулизма к 50% спирту.

К 2 мл культуральной жидкости 2-3-дневной инкубации при 28°C, содержащей ботулинический токсин типа Е, добавляют равный объем этилового спирта-ректификата. Смесь выдерживают 1 час при комнатной температуре, периодически перемешивая, а затем из нее делают высев на 2-3 чашки с печеночным агаром, содержащим желток куриного яйца (желток одного яйца добавляют в 500 мл расплавленного и охлажденного до 50°C агара). Через 48 часов инкубации при 35°C в анаэроостате, среди колоний посторонней микрофлоры, *S.botulinum* дают небольших размеров колонии, окруженные «жемчужным поясом». Следует отметить, что некоторые спорогенные анаэробы (*S.sporogenes* и др.) также имеют вокруг колоний «жемчужный пояс». Эти колонии высевают в пробирки со средой Китт-Тароцци, исследуют после инкубации в термостате в реакции нейтрализации. Особенно этот метод рекомендуется для выделения чистой культуры *S.botulinum* типа Е.

При отсутствии в лаборатории анаэроостатов для выращивания анаэробов можно использовать простой чашечный метод, где воздух просто исключается из питательного агара. Метод заключается в следующем: засеянный и слегка охлажденный агар наливается в крышку стерильной чашки Петри, после чего на агар, почти застывший, помещается вторая половина чашки Петри так, чтобы дно ее плотно соприкасалось с поверхностью залитого агара. Края чашки можно залить парафином. При этом методе поверхность стекла плотно соприкасается с агаром по всей его площади, и в слое агара, находящемся между пластинками стекла, создаются условия, благоприятные для роста самых строгих анаэробов.

Выросшие колонии нужно рассматривать в лупу или в стереоскопический микроскоп. Часть колоний используют для приготовления мазков, которые микроскопируют.

С поверхности чашки колонии снимают петлей или пастеровской пипеткой и засевают в пробирки со средой Китт-Тароцци с 0,5% глюкозы. Выросшие посевы проверяют на чистоту путем микроскопирования и на наличие токсина путем постановки реакции нейтрализации на мышах.

104.3. Метод активации прототоксина *C.botulinum*.

Активацию прототоксинов производят в экстрактах из пищевых продуктов, промывных вод желудка и рвотных масс, а также культуральной жидкости посевов, если исследуемый материал был засеян в среду без трипсина или панкреатина.

Чистый сухой трипсин растворяют перед употреблением в физиологическом растворе в концентрации 1:100 (1%-й раствор); этот раствор принимают за исходный. Для активации берут данный раствор из расчета, чтобы в активируемой культуральной жидкости его концентрация была равна 0,1%.

Трипсин может быть заменен сухим медицинским высокоактивным (активность не должна быть менее 50 единиц) панкреатином, раствор которого готовят следующим образом: 4 г панкреатина растворяют в 100 мл ИХН и оставляют в холодильнике при 4⁰С на 12 ч. Перед употреблением полученную жидкость фильтруют через плотный бумажный фильтр, а затем через стерилизующую пластинку фильтра Зейтца до получения прозрачной опалесцирующей жидкости. Готовый раствор панкреатина может сохраняться при 4⁰С в течение двух недель.

Исследуемую 4-5-суточную культуру, полученную на жидкой мясной или казеиновой среде, подвергают центрифугированию или фильтрованию с целью отделения микробных тел от культуральной жидкости.

Готовый раствор трипсина добавляют из расчета получения в культуральной жидкости концентрации 0,1%, для чего на 1 мл культуральной жидкости берут 0,1 мл исходного 1 % раствора трипсина.

Если вместо трипсина применяют панкреатин, то культуральную жидкость смешивают в равных пропорциях с готовым раствором панкреатина.

Полученные смеси помещают в термостат при 37+1⁰С на один час. По истечении указанного срока в активированной жидкости определяют наличие ботулотоксина на белых мышах путем постановки реакции нейтрализации.

Для обнаружения ботулинических токсинов рекомендован ряд других методов, каждый из которых может быть только ориентировочным и должен всегда подтверждаться реакцией нейтрализации на мышах. Это - реакция непрямой ге-

магглютинации или бентонитовой флокуляции, реакция подавления фагоцитоза, реакция двойной диффузии в геле, люминесцентно-серологический метод для обнаружения возбудителей ботулизма.

104.4. Однако, как правило, все перечисленные методы дают положительный результат в руках авторов и только с чистыми штаммами и их токсинами. Эти методы недостаточно специфичны ввиду наличия общих самотических и нетоксичных растворимых антигенов у возбудителей ботулизма и микроорганизмов группы *C.sporogenes* и *C.putrificum*. Кроме того, эти реакции не выявляют степени токсичности фильтрата. В силу вышесказанного ни один из указанных методов не применяется, как общепринятый, ни в одной стране. Только биологическая проба на белых мышах в реакции нейтрализации с типоспецифическими противоботулиническими сыворотками является общепринятым методом, метод принят международной ассоциацией микробиологов.

ГЛАВА 12 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

105. *C.perfringens* – вид бактерий рода *Clostridium* – один из наиболее распространенных патогенных видов. По способности образовывать четыре главных токсина (α -, β -, ϵ -, τ -) микроорганизмы разделяют на шесть сероваров: А, В, С, D, Е и F. *C.perfringens* распространены повсеместно; бактерии выделяют из воды почвы, сточных вод. Они колонизируют кишечник животных и человека (выделяют у 25-35% здоровых лиц). Других природных резервуаров помимо пищеварительного тракта *C. perfringens* не имеют, почва и другие объекты внешней среды обсеменяются ими только фекальным путем. У человека *C.perfringens* вызывает два типа поражений – газовую гангрену и пищевые токсикоинфекции.

106. Вегетативные клетки *C.perfringens* представлены короткими крупными палочками с обрубленными под прямым углом концами (0,6-1,0x1x1,5 мкм). Отличительные особенности бактерий – строго положительная окраска по Граму и отсутствие подвижности. *In vivo* образуют капсулу. Бактерии хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, в старых культурах могут быть грамотрицательными. Споры крупные овальные расположены центрально или субтерминально. Термоустойчивость спор сероваров В и D относительно невысока, погибают при кипячении в течение 15-30 мин, споры типов А и С более устойчивы и выживают при кипячении в течение 1-6 часов. *C.perfringens* типа А относительно толерантна к кратковременным кислородным воздействиям и способна расти в высоких столбиках сред, без герметизации вазелиновым маслом. На плотных средах бактерии образуют S-и R- колонии. S-колонии круглые, сочные, куполообразные, с гладкими ровными краями. Сначала они прозрачные, позднее становятся мутными серовато-белыми, R- колонии неправильной формы, бугристые с неровными шероховатыми краями; в глубине агара напоминают комочки ваты. На агаре с кровью обычно окружены зоной гемолиза. Характерное свойство колоний *C.perfringens* типа А, служащее дифференцирующим признаком, – способность менять серовато-белый цвет на зеленовато-оливковый после кратковременного пребывания в анаэробных условиях. На желточном агаре бактерии образуют колонии, окруженные зоной перламутрового преципитата, образующегося из ле-

цитина куриного желтка под действием лецитиназы. Культуры *S.perfringens* типа А имеют характерный запах масляной кислоты. Оптимум рН 7,2-7,4, но могут расти в интервале 5,0-8,5. На средах содержащих глюкозу рост происходит очень бурно, с образованием H_2 и CO_2 и заканчивается через 8-12 часов. Первые признаки роста на среде Китт-Тароцци могут проявляться уже через 1-2 часа (особенно при $43^{\circ}C$) и проявляются помутнением и появлением пузырьков газа. Бактерии ферментируют углеводы с образованием кислоты и газа, От прочих *S.perfringens* отличает способность восстанавливать нитраты, расщеплять лактозу, образовывать лецитиназу. Протеолитическая активность слабая: расжижает желатину, не разлагает казеин, интенсивно створаживает молоко. *S.perfringens* образует 12 токсинов (ферментов) и энтеротоксинов. Продуцентами энтеротоксина являются бактерии типов А и С, вызывающие пищевые токсикоинфекции.

107. *S.perfringens*, типов В, Д, Е вызывают тяжелые энтеротоксемии у мелкого и крупного рогатого скота, а также у птиц, можно предполагать их этиологическое значение при пищевых отравлениях у людей, в случае употребления в пищу мяса животных, обсемененных штаммами этих типов. *S.perfringens* типа А вызывает токсикоинфекции легкой и средней степени тяжести. Заболевание развивается остро, с болями в животе, рвотой и диареей (до 20 раз в сутки). Симптомы исчезают в последующие 12-24 ч, летальные исходы наблюдаются редко. Установлено, что при пищевых токсикоинфекциях, вызываемых *S.perfringens* типа А, основную роль в патогенезе заболевания играет энтеротоксин, вырабатываемый *in vivo* спорулирующими клетками этих микроорганизмов, которые попадают в желудочно-кишечный тракт при интенсивном обсеменении пищевых продуктов (10^5 и более в г(см³)) указанными бактериями. *S.perfringens* типа С вызывает некротический энтерит. При острых формах болезнь может закончиться смертью пациента, в течение 18-24 ч. Симптомы аналогичны поражениям, вызываемым бактериями серовара А. Пищевые отравления чаще имеют место после употребления готовых мясных блюд, а также продуктов растительного происхождения, которые оказываются значительно обсемененными клетками *S.perfringens* типа А в результате нарушения правил приготовления и хранения пищи.

108. Критерии диагностики. При наличии клинических симптомов заболевания результаты бактериологического исследования подтверждают диагноз пищевого отравления, если получены следующие данные анализа: высокая обсемененность *S.perfringens* (более 10^5 в г(см³)) пищевых продуктов или 10^6 в 1 г фекалий.

109. Бактериологические исследования.

109.1. Первый день.

В пищевых продуктах и материале от больного (исключая кровь) определяют: наличие бактерий *S.perfringens* и массивность обсеменения этими микроорганизмами, наличие токсигенных штаммов *S.perfringens* типов А, В, С, Д, Е. В крови больного с явлениями анаэробного сепсиса и материалах от трупа определяют наличие *S.perfringens* типов А, В, С, Д, Е и их специфических токсинов.

Из подготовленных к исследованию материалов (пищевые продукты, рвотные массы, испражнения и др.) готовят разведения на 0,1% пептонной воде до 10^{-10} .

По 1 мл материала из соответствующих разведений переносят в расплавленную и охлажденную до 45⁰С среду Вильсон-Блер, разлитую по 8-9 мл в пробирки. Можно так же использовать кровяной или желточный агары в чашках. Для этого 1 мл каждого разведения добавляют в 15 мл охлажденного до 45⁰С агара, тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри. После застывания смеси заливают дополнительно стерильным, охлажденным до 45⁰С 2% мясо-пептонным агаром, слоем не менее 2 мм. Инкубируют 6-8 часов в термостате при 45-46⁰С или 20 часов при 37+1⁰С. Кроме того, гомогенаты исследуемых материалов засевают в объеме 10-15 мл на любую из жидких сред (Китт-Тароцци и др.) разлитых по 70 мл во флаконы. Каждый образец материала (исключая кровь) вносят в 2 флакона среды, один флакон с посевом прогревают при 80⁰С 20 минут, а другой - не прогревают, затем оба флакона инкубируют при 37+1⁰С. В условиях прогревания обычно погибает посторонняя микрофлора и часть анаэробов, находящихся в вегетативной форме. Сохраняются споры *C.perfringens*, которые в этих условиях активно прорастают. В выросших культурах из прогретых посевов в ряде случаев, может находиться только *C.perfringens*, т.е. чистая культура этих бактерий. Кровь, в случае бактериемии, взятая стерильно, будет содержать только вегетативные клетки *C.perfringens*. Поэтому посев крови производится без прогревания. Интенсивное газообразование, которое свидетельствует об активном росте культуры, может наблюдаться через 3-6 часов после посева материала, доставленного не позже суток. В этом случае следует проводить бактериологические исследования в первый день. При отсутствии активного роста через 6-8 часов, посеы инкубируют при 37+1⁰С в течение 18-20 часов.

109.2. Второй день.

В посевах на среде Вильсон-Блер производят подсчет черных колоний, где имеется от 10 до 30 колоний, или на чашках, где содержится от 20 до 100 колоний с зоной гемолиза, или с зоной опалесценции. Умножают количество колоний на разведение материала в этой пробирке, или чашке Петри. Так, если в 6 пробирке или чашке содержится 30 характерных колоний, обсемененность 1 г (см³) или 1 мл исходного материала будет составлять 30x10⁶. Делают мазки из 3-5 характерных колоний, окрашивают краской для анаэробов или по Граму. Кроме того, 2-4 колонии пересевают на лакмусовое молоко и 3-5 колоний на любые из мясных сред в пробирках для получения чистой культуры.

Определение токсинов следует проводить через 3-6 часов после посева материала на жидкие среды при появлении признаков начала роста культуры (см. первый день исследования), или на вторые сутки, если посевной материал вырастает только через 18-20 часов инкубирования. Из культур на жидких средах, где отмечен рост с газообразованием, готовят мазки, окрашивают по Граму или краской для анаэробов. Те посеы, в которых обнаруживают грамположительные палочки, похожие по морфологии на *C.perfringens*, проверяют на присутствие специфических токсинов *C.perfringens* типов А, В, С, D, Е методом реакции нейтрализации с диагностическими сыворотками *C.perfringens* типов А, В, D, Е на белых мышцах весом 16-18 г.

Сухие противоперфрингенс сыворотки перед употреблением разводят дистиллированной водой. В каждую ампулу с сухой сывороткой добавляют по 1 мл воды, при легком встряхивании сыворотка полностью растворяется. Затем сыво-

ротки А, В, D, Е разводят в 10 раз ИХН и в разведенном виде применяют для постановки реакции нейтрализации.

Постановка реакции нейтрализации. Из флаконов в стерильных условиях отбирают по 8-10 мл культуральной жидкости. Оставшуюся культуру во флаконах хранят при температуре 4-10⁰С до окончания исследования. После центрифугирования три 3000-5000 об/мин в течение 30 мин в надосадочной жидкости должны находиться токсины *C. perfringens*. Первоначально ставят реакцию нейтрализации токсина в исследуемой жидкости с сывороткой *C. perfringens* типа А. Для этого в 2 пробирки вносят по 1,5 мл надосадочной жидкости. Затем в 1 пробирку добавляют 0,75 мл антитоксической сыворотки типа А, во 2-ю контрольную – 0,75 мл физиологического раствора. Смесь выдерживают 30 минут при 37+1⁰С, затем вводят по 0,75 мл в хвостовую вену 2-ум белым мышам весом 16-18 г. Сначала вводят смесь из контрольной пробирки, затем тем же шприцом – смесь из опытной пробирки. Реакцию учитывают через сутки.

109.3. Третий день.

Просматривают пробирки с посевами на лакмусовом молоке. Появление характерного сбраживания с просветлением сыворотки и образованием сгустка кирпичного цвета является дополнительным подтверждением того, что колонии черного цвета, а также колонии с зонами гемолиза и преципитата на плотных средах, определяющие обсемененность исследуемого материала, относятся к *C. perfringens*.

Учитывают реакцию нейтрализации. Если контрольные мыши пали, а получившие смесь токсина с сывороткой типа А – живы, следует дать заключение, что в исследуемом материале обнаружен *C. perfringens* типа А, активностью не менее 3 Д₁м/мл (для белой мыши) и закончить исследование. В том случае, если контрольные мыши и получившие смесь токсина с сывороткой типа А пали, следует ставить развернутую реакцию нейтрализации с сыворотками *C. perfringens* типов В, D, Е. Для выявления штаммов типов D и Е следует проводить активацию протеолитическими ферментами неактивных прототоксинов, вырабатываемых штаммами типов D и Е. Способ приготовления рабочих растворов протеолитических ферментов изложен в главе 11 настоящей Инструкции. Приготовленный 4% рабочий раствор панкреатина добавляют к надосадочной жидкости в соотношении 1 мл панкреатина к 3 мл надосадочной жидкости. Для активации также можно пользоваться трипсином; для этого 1% рабочий раствор трипсина добавляют к надосадочной жидкости до концентрации 0,1% (на 1 мл надосадочной жидкости берут 0,1 мл рабочего раствора трипсина). Смесь токсина с ферментом помещают в термостат при 37+1⁰С на 1 час, после чего разводят в 3 раза и ставят развернутую реакцию нейтрализации с культуральной жидкостью после активации ферментами для обнаружения токсинов типов D и Е. Кроме того, ставят реакцию нейтрализации с неактивированной культуральной жидкостью, разведенной в 2 раза для выявления токсинов типов В и С.

109.4. Метод постановки развернутой реакции нейтрализации. В пять пробирок разливают исследуемую надосадочную жидкость: в первую и вторую пробирки – по 1,5 мл без активации, в третью, четвертую и пятую – по 1,5 мл жидкости после активации. Добавляют по 0,75 мл антитоксические диагностические сыворотки: в первую пробирку – типа В, в третью – типа D и четвертую – типа Е.

Вторая и пятая пробирки являются контрольными на присутствие токсинов, в них добавляют по 0,75 мл физиологического раствора. Смеси выдерживают 30 минут при $37+1^{\circ}\text{C}$ и вводят внутривенно по 0,75 мл двум белым мышам из каждой пробирки. Результаты учитывают через сутки. При наличии токсинов *S.perfringens* гибнут мыши, получившие раствор из контрольной пробирки. Выживают мыши, получившие смесь токсина с гомологичной сывороткой. Так, если в исследуемом материале находится токсин типа В или типа С, выживут мыши, получившие смесь исследуемой культуры с сывороткой типа В, контрольные мыши падут. При обнаружении токсина нейтрализующегося сывороткой типа В следует считать, что в исследуемом материале содержится *S.perfringens* типа В либо типа С. Присутствие одного из токсинов типов В, С, D, Е в исследуемом материале в сочетании с характерной клинической картиной дает основание считать, что пищевое отравление вызвано штаммами одного из указанных типов *S.perfringens*.

109.5. Выделение чистой культуры.

Чистую культуру *S.perfringens* необходимо выделять и исследовать в случае нечеткого результата реакции нейтрализации, при наличии в первичных посевах исследуемого материала (т.е. во флаконах) смешанной культуры, где, наряду с *S.perfringens*, присутствует посторонняя микрофлора.

Чистую культуру *S.perfringens* можно получить путем посева на мясные среды в пробирках отдельных характерных колоний (черные на среде Вильсон-Блер, а также окруженные зоной гемолиза, или перламутрового преципитата - на кровяном или желточном агаре). Колонии на плотных средах вырастают на 2-й день исследования при изучении обсемененности материала. Колонии, характерные для *S. perfringens*, высевают (по 3-5 колоний из посева каждого образца исследуемого материала) на мясные среды в пробирках (см. 2-й день исследований). Через 18-20 часов в выросших посевах определяют методом микроскопирования наличие однородной культуры с морфологией, характерной для *S.perfringens*. Пробирки с культурами хранят при $4-10^{\circ}\text{C}$ и используют в дальнейшем для изучения чистой культуры.

Для выделения чистой культуры из трупного материала, который не изучается на обсемененность *S.perfringens*, следует использовать культуры первичных посевов во флаконах (см. 2-й день исследования, определение токсинов). Для выделения отдельных колоний используют среду Вильсон - Блер, а также кровяной или желточный агары в чашках Петри, куда стерильно вносят 1-2 капли культуры, затем производят рассев на 2-3 чашки шпателем. Посевы в чашках Петри выращивают в анаэробных условиях в течение 24 ч при $37+1^{\circ}\text{C}$. Выросшие отдельные колонии пересевают на мясную среду.

Для определения типовой принадлежности выделенных штаммов *S.perfringens* посевной материал из пробирок с мясной средой пересевают в объеме 2-3 мл на одну из жидких питательных сред (Китт-Тароцци) во флаконах.

В выросшей культуре устанавливают присутствие специфических токсинов *S.perfringens* методом реакции нейтрализации с типовыми антитоксическими диагностическими противоперфрингенс сыворотками типов А, В, D, Е согласно п.109.2.

ГЛАВА 13
САМПУЛОБАКТЕР

110. Кампилобактерии – извитые бактерии рода *Campylobacter*. Обнаруживаются в желудочно-кишечном тракте, в полости рта и гениталиях человека и животных. Известны более 10 видов возбудителей, из них наибольшее значение в патологии человека имеют *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* (типовой вид). Упрощенная классификация кампилобактерий, согласно приложению 26 к настоящей Инструкции.

111. Кампилобактериоз – типичная зоонозная инфекция. Важнейшим источником инфекции для человека являются сельскохозяйственные животные и домашние птицы, среди которых лидирующее положение занимают коровы и куры. Возможно также заражение от кошек, собак, декоративных птиц. Заболевания человека, при которых в роли этиологического агента выступают бактерии рода *Campylobacter* подразделяют на 4 группы: поражения пищеварительного тракта (диарея, гастроэнтерит, энтероколит); генерализованные и/или локализованные некишечные формы инфекции (артрит, септический тромбофлебит, менингит, септицемии); перинатальные инфекции; заболевания ротовой полости. Наибольшее значение кампилобактерии имеют как возбудители диарейных заболеваний.

112. Заражение от человека к человеку происходит редко, главным образом при несоблюдении правил личной гигиены. Кампилобактериоз регистрируется как в виде спорадических заболеваний, так в виде вспышек. Ведущую роль при этом играют пищевой и водный пути передачи. Наибольшее значение среди факторов передачи кампилобактериозной инфекции имеют мясопродукты. Роль молока, как возможного фактора передачи при кампилобактериозной инфекции подтверждена многочисленными эпидемиологическими данными.

113. К роду *Campylobacter* относятся грамотрицательные спирально изогнутые вокруг длинной оси извитые формы, длиной 0,5-5,0 мкм и шириной 0,2-0,5 мкм, существующие в виде одиночных, так и попарно расположенных, не разошедшихся после деления клеток, напоминающих «крылья чайки». Не образуют спор и капсул, обладают одним, двумя полярно расположенными жгутиками, обеспечивающими высокую подвижность «шпорообразным» характером движения, каталазопозитивные. Микроэрофилы растут в атмосфере, богатой CO₂, с пониженным содержанием кислорода. Оптимальная атмосфера инкубации 5-7% O₂, 10% CO₂, 83-85% N₂. Микроаэрофильные условия могут быть созданы с помощью газогенерирующих, каталитических газогенерирующих и безкаталитических газогенерирующих пакетов, анаэроостатов, «свечного сосуда». Аэротолерантность кампилобактеров повышается при введении в состав питательных сред, добавок связывающих супероксид-ион и другие активные формы кислорода. К ним относятся кровь, активированный уголь, FBP-добавки. FBP-добавка: железа II сульфат, натрия пируват, натрия метабисульфит в концентрации 0,025% каждой из солей. Культуральные свойства. На жидких средах – легкое помутнение среды, на полужидких – диск на расстоянии 3-5 мм от поверхности, на плотных средах два типа колоний, колонии первого типа – крупные, неправильной формы, влажные, блестящие («капли конденсата»), колонии второго типа – мелкие, округлые, приподнятые с ровными краями. Питательными основами для вы-

ращивания кампилобактерий являются: агар Мюллера-Хинтона, Колумбийский агар, триптозный агар для бруцелл, эритрит агар и др. При проведении идентификации используют: температурный тест (25⁰С, 37⁰С, 42⁰С), каталазный и оксидазный тест, окраску по Грамму кристаллвиолет или 1% раствор фуксина, гидролиз гиппурата, гидролиз индоксилацетата, резистентность к цефалотину и налидиксовой кислоте.

114. Лабораторная диагностика кампилобактериоза.

114.1. Принципы микробиологической диагностики включают бактериоскопические, бактериологические и серологические методы. Материалом для исследования являются: испражнения, кровь, вода, различные пищевые продукты. Основным методом лабораторной диагностики является бактериологический метод.

114.2. Сбор и транспортировка исследуемого материала.

По уровню чувствительности к дезинфектантам кампилобактеры близки к кишечной палочке. Натрия гипохлорид в концентрации 1,25мг/л, 0,15% растворы фенольных соединений, йодоформ в концентрации 10мг/л, 70% этиловый спирт, 0,125% глутаровый альдегид вызывают гибель *S. jejuni* в течение 1мин, поэтому предметы ухода за больными, откуда осуществляется забор образцов нативных фекалий (подкладные судна, горшки и др) после дезинфекционной обработки следует тщательно промыть водой.

При острых кишечных инфекциях для исследования на кампилобактериоз забирают нативные испражнения, или содержимое прямой кишки с помощью ректальной петли. Исследование испражнений, полученных путем естественной дефекации, является предпочтительным, так как объем материала больше, чем при использовании ректальной петли, что способствует лучшему сохранению кампилобактеров. Если доставка материала производится в течение 1 ч, можно обойтись без транспортных питательных сред. Если более 1 ч необходимо использовать транспортные среды (Кэрри-Блер, Амиеса), соотношение материала к среде 1:3-1:5.

Забор материала следует проводить в возможно ранние сроки от начала заболевания, до начала антибактериальной терапии, а также на протяжении заболевания для контроля эффективности лечения. Применение транспортных сред при использовании ректальных петель обязательно. Микроскопическое исследование тонкого мазка, окрашенного 1% раствором фуксина в течение 10-30 сек. или окраска кристаллическим фиолетовым позволяет быстро обнаруживать спиралевидные или S-образные бактерии. Возможно применение фазово-контрастной микроскопии суспензий фекалий в жидкой среде.

114.3. Выделение *Campylobacter* из фекалий.

Протокол выделения *Campylobacter* их фекалий согласно приложению 27 к настоящей Инструкции. Пробу фекалий 1 мл или 1 г эмульгируют в 9 мл физиологического раствора. Затем производят посев на селективную среду (кровяной эритрит-агар (далее КЭА), угольный эритрит-агар (далее УЭА)) и др. коммерческие среды. Инкубируют при 42⁰С от 1 до 5 дней в микроаэрофильных условиях с ежедневным учетом роста. На средах без крови: колонии серые и коричневые с металлическим блеском или без него. На средах с кровью: серые или коричневые. Из подозрительных колоний готовят мазки и окрашивают по Граму, изучают по-

движность методом «раздавленной и висячей» капли, проводят тест на оксидазу, каталазу, тест с КОН, гидролиз гиппурата, индоксилацетата. Обнаружение в мазках типичной для кампилобактерий морфологии является основанием для посева материала на поверхность селективной среды для накопления чистой культуры. Посевы инкубируются при 42⁰С в течение 48 часов в микроаэрофильных условиях. Из материала выделенных культур готовят мазки и окрашивают их по Граму, затем изучают подвижность культуры методом «раздавленной или висячей» капли. Кампилобактериям свойственна высокая подвижность, движение его носит стремительный, мечущийся из стороны в сторону характер, «шпорообразно» ввинчивающийся в окружающую среду.

Тест на оксидазу. Нанести колонию на влажный диск (для определения оксидазы), помещенный на стекло. Появление синей окраски в течение 10 секунд расценивается как положительный результат.

Тест на каталазу. Растереть несколько колоний на предметном стекле, добавить 1-2 капли 3% перекиси водорода, перемешать. Появление пузырьков свидетельствует о продукции каталазы. Снимая колонию с агара, содержащего кровь, во избежание ложноположительной реакции постараться не касаться агара.

Метод тяжа (тест с КОН). Каплю 3% раствора КОН смешать с колонией микроорганизма на предметном стекле, затем потянуть петлю снизу вверх. Появление длинных нитей, тянущихся вслед за петлей означает положительную реакцию.

Тест на резистентность к налидиксовой кислоте, цефалотину. Материал суточной культуры исследуемого штамма, выращенного на среде без антибиотиков, инокулируется (посев штрихом или бляшкой) на поверхность эритрит-агара с 5% крови, ФВР добавками с 30 мг/л налидиксовой кислоты (цефалотина). Посевы инкубируются при 37+1⁰С в течение 72 часов в микроаэрофильных условиях. Наличие роста в зоне инокуляции свидетельствует о резистентности культуры к налидиксовой кислоте (цефалотину). Тест можно реализовать при наличии стандартных дисков с цефалотином и налидиксовой кислотой (концентрация по 30 мкг на диск).

Температурный тест. При постановке этого теста определяется способность штамма к росту 25, 37, 42⁰С. Постановка температурного теста возможна как на плотной, так и на полужидкой среде. Посев культуры производят в столбик полужидкого агара, в 3 пробирки, после чего одну инкубируют при 25⁰С, вторую при 37+1⁰С, третью при 42⁰С. Посевы инкубируют в микроаэрофильных условиях в течение 48 часов.

Тест на гидролиз гиппурата. Взять несколько колоний 18-24 часовой культуры, проэмульгировать в пробирке с раствором гиппурата, чтобы получить чистую суспензию. Хорошо перемешать и инкубировать при 37+1⁰С в течение 2 ч на водяной бане. Вновь перемешать и затем по стенке пробирки осторожно наслоить на поверхность питательной среды 3,5% раствор нингирида, вновь инкубировать 10 мин при 37+1⁰С на водяной бане и учесть реакцию.

Тест на гидролиз индоксилацетата. Приготовленную заранее сухую бумажную полоску, пропитанную индоксилацетатом смочить стерильной дистиллированной водой, избыток воды удалить стерильным ватным тампоном, затем нане-

сти на полоску колонию *Campylobacter*. Появление в течение 5-10 мин синезеленой окраски указывает на положительную реакцию.

Биохимическая характеристика основных видов *Campylobacter* представлена в приложении 28 к настоящей Инструкции.

Метод фильтров. Метод основан на активной подвижности *Campylobacter* в полужидких средах. Используются мембранные, ацетатно-целлюлозные с порами 0,45 или 0,65 мкм ядерные, трековые фильтры.

Первый день. Приготовить чашку Петри со средой КЭА, Мюллер-Хинтон с добавлением 5% крови, положить стерильный фильтр (0,45 или 0,65 мм) на поверхность свежеприготовленного агара и оставить его для пропитывания. Нанести пипеткой 6 капель суспензии (1:10 пробы фекалий в физиологическом растворе). Выдержать посев при $37+1^{\circ}\text{C}$ 30-45 мин (для пассивной фильтрации). Осторожно убрать фильтр и инкубировать в микроаэрофильных условиях в течение 5 суток при $37+1^{\circ}\text{C}$ с ежедневным учетом роста.

Второй день. Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму. Подозрительные колонии пересевают на Колумбия агар с 5% кровью и инкубируют в микроаэрофильных условиях при 42°C в течение суток. Дальнейшую идентификацию проводят согласно п.114.3.

114.4. Выделение *Campylobacter* из продуктов и воды, согласно приложению 29 к настоящей Инструкции.

Проба продукта или воды 1 г или 1 мл (10г-10мл; 25г или 25мл). Соотношение количества пробы к объему среды обогащения должно составлять 1:9, чем большее количество посевного материала, тем большая вероятность выделения кампилобактер.

Первый день. Гомогенизируют пробу в бульоне Престона. Затем пробирки (флаконы) инкубируют (обогащение) при 42°C в микроаэрофильных условиях 24 часа.

Второй день. Проводят пересев со среды обогащения на селективную среду (КЭА, УЭА) и инкубируют при 42°C в микроаэрофильных условиях 1-5 суток с ежедневным просмотром результатов.

Дальнейшую идентификацию проводят с помощью фенотипических тестов и биохимических характеристик согласно п. 114.3.

115. Серологическая диагностика заболеваний вызываемых кампилобактером. Антигенная структура кампилобактерий представлена Н-Аг и О-Аг, а также кислоторастворимыми белковыми фракциями, имеющими ведущее значение в серотипировании. Н-Аг – термолабильные, разрушаются нагреванием при $75-100^{\circ}\text{C}$, О-Аг- термостабильные – выдерживают кипячение в течение 2,5ч.

116. В практике используется реакция непрямой гемагглютинации, коагглютинации, иммунноферментный анализ, иммунноэлектрофорез, латекс-агглютинация. Экспресс-диагностика включает постановку РИФ со специфическими люминесцентными сыворотками. Молекулярная идентификация основана на ПЦР и позволяет выявить многие виды *Campylobacter* редко встречающиеся или плохо культивируемые. Преимуществом ПЦР над методами культивирования является прямое выявление и идентификация вида микроорганизма из пробы, но этот метод не позволяет провести серотипирование или определить чувствительность к антибиотикам.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЯМИ

117. С целью улучшения диагностики заболеваний, вызываемых энтеробактериями, а также при проведении эпидемиологического анализа и выявления 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 сальмонеллезов, в меньшей степени – при дизентерии. В случае выделения условно-патогенных энтеробактерий серологические исследования могут иметь определенное значение при оценке этиологической роли выделенных микробов.

118. Наиболее специфичным и чувствительным методом титрования антител является реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА). Для постановки РПГА с целью выявления антител к О-антигенам возбудителей брюшного тифа, паратифов, других сальмонеллезов и дизентерии применяют коммерческие стабильные эритроцитарные диагностикумы. При отсутствии эритроцитарных О-диагностикумов, а также для выявления Н-антител применяют реакцию агглютинации (типа Видаля) с соответствующими коммерческими О- и Н-диагностикумами. Для серологической диагностики инфекций, вызываемых УПЭ (*Esherichia*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Proteus* и др.), коммерческие препараты не выпускают, поэтому реакцию агглютинации ставят с аутоштаммами.

119. При постановке любой из указанных 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. Величину «диагностического» титра 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. Постановку и учет реакций осуществляют в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к диагностикумам.

ГЛАВА 15

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ (ВОДЫ, СМЫВОВ)

120. Бактериологическое исследование микробной обсемененности объектов внешней среды при пищевых отравлениях предусматривает: выявление бактерий группы кишечной палочки (далее – БГКП) и при необходимости дальнейшее исследование с идентификацией до *E.coli*, выявление бактерий рода *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, стафилококка и других микроорганизмов.

121. Забор проб с поверхностей различных объектов осуществляют методом смывов или бакпечатков. При исследовании следует обращать внимание на разделочные доски, мясорубки, производственные столы для готовой пищи, особенно в цехе приготовления холодных закусок. Смывы с крупного оборудования берут с поверхности 100см^2 , с использованием трафарета, площадью 25см^3 . При взятии смывов с мелких инструментов обтирается вся поверхность предмета, при заборе смывов с тарелок протирают всю внутреннюю поверхность. При взятии смывов с мелких предметов одним тампоном протирают три одноименных предмета. У столовых предметов протирают их рабочую часть, при исследовании стаканов протирают внутреннюю поверхность и верхний наружный край стакана на 2 см вниз. При взятии смывов с рук протирают тампоном ладонные поверхности обеих рук, проводя не менее пяти раз по каждой ладони и пальцам, затем протирают межпальцевое пространство, ногти и подногтевые пространства. При взятии смывов с санитарной одежды протирают четыре площадки по 25см^2 , с различных мест полотенца берут четыре площадки по 25см^2 . При взятии смывов с яичной скорлупы один тампон используют для исследования 10 яиц. Взятие смывов проводят с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов на стеклянной или деревянной палочке, или небольшими марлевыми салфетками ($5\times 5\text{ см}$), простерилизованными в бумажных пакетах или в чашках Петри. Для увлажнения тампонов в пробирки с тампонами наливают по 5,0 мл стерильного раствора нейтрализатора. При применении дезинфектантов, содержащих хлор или перекись водорода, в качестве увлажняющей жидкости следует использовать раствор нейтрализатора (1% пептонная вода + 3% ТВИН-80 + 0,5% тиосульфата натрия), при применении других - 1% пептонная вода + 3% ТВИН-80 + 0,3% лецитина. При использовании салфеток стерильный раствор нейтрализатора разливают в стерильные флаконы по 5,0 мл. Салфетку захватывают стерильным пинцетом, увлажняют нейтрализатором и, после протирания исследуемого объекта, помещают во флакон. В исключительных случаях для увлажнения тампонов используют стерильный ИХН, или 0,1% пептонную воду, разлитые во флаконы по 5 мл, тампоны увлажняют непосредственно перед взятием смывов. При обработке жирной поверхности следует пользоваться сухими тампонами.

122. Для выделения стафилококков производят посев смывной жидкости непосредственно на чашку Петри с желточно-солевым агаром, тампон помещают в среду накопления (бульон с 6,5% хлористого натрия, бульон с 1% глюкозы), разлитые в пробирки по 5 мл. Засеянные пробирки инкубируют при 37°C в течение 20-24 часов, после чего делают высев на ЖСА. Идентификацию выделенной культуры проводят согласно главе 9.

123. Определение БГКП с идентификацией до *E.coli*. К БГКП относятся факультативно-анаэробные, грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, сбразивающие лактозу (глюкозу) с образованием кислоты и газа при $(37+1)^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов, в основном, являющиеся представителями родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* (т.е. учитываются цитратположительные и цитратотрицательные варианты БГКП). Для выявления БГКП производят посев на среду обогащения, для чего тампон (марлевую салфетку) погружают в 10-20% желчный бульон или среду Кесслера. Через сутки инкубирования при $37+1^{\circ}\text{C}$ делают пересев на среду Эндо. При отсутствии на

среде Эндо колоний, типичных для БГКП (красных и темно-красных с металлическим блеском или без него, розовых или бледно-розовых), выдают заключение об отсутствии БГКП. При наличии на среде Эндо характерных колоний из них готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют; выполняют пробу на оксидазу. Наличие в мазках грамотрицательных, оксидазоотрицательных палочек предполагает присутствие БГКП. Исследуемые колонии засевают на среду Гисса с лактозой или глюкозой. Инкубируют $37+1^{\circ}\text{C}$ 24 часа. Первичный учет проводят через 4-6 ч. Производят пересев на среду Эндо. Все типичные колонии подвергают идентификации по ИМАЦ-тестам (реакция на индол, реакция с метиловым красным, реакция Фогес-Проскауэра, утилизация цитрата). Дальнейшее исследование с идентификацией до *E.coli* проводят как описано в главе 5 настоящей Инструкции. При выявлении на среде Эндо мелких бесцветных колоний, подозрительных на наличие возбудителей кишечных инфекций, колонии снимают и изучают на принадлежность к патогенным микроорганизмам семейства *Enterobacteriaceae*.

124. При целенаправленном исследовании на выявление бактерий рода *Salmonella* в пробирку наливают 2 мл предварительной среды обогащения - забуференной пептонной воды рН7,0 (готовят как фосфатно-буферную смесь, но вместо дистиллированной воды используют пептонную воду). Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняют, забирают смыв, тампон погружают в предварительную среду обогащения, инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. После инкубирования пересевают в среду обогащения (селенитовую, магниевую), в пробирку с посевом смыва добавляют 10 мл среды. Инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч, производят пересев на чашки Петри с плотными питательными средами (висмут-сульфит агар, среда Плоскирева, Эндо, ЭМС и др.), посеvy инкубируют при $37+1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Идентификацию выделенных культур проводят согласно главе 3.

125. При санитарно-бактериологическом контроле на предприятиях пищевой промышленности, общественного питания, торговли пищевыми продуктами, в учреждениях для детей, в организациях здравоохранения возможно применение метода отпечатков на «Бактотесты» (метод обнаружения БГКП), исследования проводятся по МУК РБ 11-15-3-2002.

126. Исследование проб воды для определения патогенных бактерий кишечной группы проводят методом мембранной фильтрации или методом посева в среды накопления с дальнейшей идентификацией возбудителя согласно главе 3 и 4 настоящей Инструкции.

ГЛАВА 16

УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

127. Для ускоренной диагностики и обнаружения патогенных микроорганизмов в первые сутки исследования из объектов внешней среды (вода, смывы, пищевые продукты и т.д.), применяют метод флюоресцирующих антител, или люминесцентносерологический метод, относящийся к однофазовым серологическим реакциям антиген-антитело. Сущность метода заключается в том, что по известному антителу, меченному флуорохромом (изоцианат флуоресцеина, радомин и др.) определяют неизвестный антиген. Происходит соединение антигенов

бактерий с соответствующими специфическими антителами, мечеными флюоресцирующими красителями. Для просмотра препаратов используют люминесцентные микроскопы. Цвет свечения зависит от цвета люминесцентного красителя, применяемого для метки сыворотки. В случае положительной реакции на темном фоне препарата видны клетки характерной морфологии светящиеся по периферии. Оценка результатов проб непосредственно из объектов внешней среды с целью обнаружения возбудителей должна быть очень осторожной. Использование люминисцирующих сывороток позволяют получить ответ, имеющий лишь сигнальное, ориентировочное значение. Основная причина этого – существование общности антигенной структуры среди различных видов бактерий, что приводит к ложноположительному окрашиванию сопутствующей микрофлоры.

Препараты для исследования готовят путем непосредственного нанесения материала на предметное стекло, 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 20 % суспензию в ИХН. Для мазка используют верхнюю часть суспензии после ее отстаивания в течение 20 мин. или центрифугировании при 1000 оборотов в мин. в течение 5-10 мин. При подрачивании в средах обогащения их выдерживают при согласно главе 3в течение 18-24 ч, на плотных средах 24 ч – после чего готовят мазки. Для выявления энтеробактерий используют прямой и непрямой метод.

127.1. Прямой метод – мазки исследуемого материала подсушивают на воздухе и фиксируют 96⁰С этиловым спиртом в течение 15 мин или путем трехкратного проведения через пламя горелки. Препараты помещают во влажную камеру, наносят на них каплю люминесцирующей сыворотки в рабочем разведении на срок, указанный в наставлении по применению люминесцирующей сыворотки. После экспозиции мазки промывают ИХН в течение 10 мин, ополаскивают дистиллированной водой и подсушивают на воздухе. Фиксированные мазки можно хранить несколько дней в холодильнике. Микроскопируют в люминесцентном микроскопе, 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 отличии от неспецифического, характеризующегося равномерным свечением всего тела клетки. Для оценки интенсивности свечения используют систему четырех плюсов: + + + + очень яркая флюоресценция на перифирии клеток, четко контрастирующая с темным телом бактерий; + + + яркая флюоресценция перифирии клетки; + + или + слабое свечение перифирии клетки не контрастирующая с телом клетки. Положительным результатом считают реакции на + + + + или + + + при наличии 2-5 и более специфически светящихся клеток в каждом поле зрения. В отношении антигенно обособленных энтеробактерий например *S. sonnei*, для положительного ответа достаточно обнаружить в препарате единичные ярко светящиеся палочковидные микробы. Прямая микроскопия мазка из нативного материала от больных при высокой концентрации возбудителя (500 тысяч -1млн клеток в 1 г, позволяет дать положительный ответ через 45-60 мин.

127.2. Непрямой метод на препарат, содержащий антиген, наносят капли диагностической немеченой сыворотки и оставляют при комнатной температуре на 10-20 мин (во влажной камере), промывают ИХН дважды по 10 мин. Мазки подсушивают на воздухе на 10-20 мин наносят капли люминесцирующей анти-видовой сыворотки против глобулинов того вида животного, от которого получена примененная иммунная сыворотка. Мазки промывают и просматривают как при прямом методе. Для непрямого метода обязателен контроль: изучаемый антиген, обработанный люминесцирующей сывороткой.

Метод применяют в качестве экспресс-метода индикации. Окончательное заключение может быть выдано только на основании выделения из исследуемого материала возбудителя и полной его дальнейшей идентификации.

128. Для ускоренного микробиологического исследования пищевых продуктов возможно использование автоматизированных экспресс-методов с использованием микробиологических экспресс-анализаторов, представляющих собой измерительные системы для определения микробной обсемененности и выявления различных микробов, принцип действия которых основан на регистрации изменения электрического сопротивления (импеданса) питательной среды, оптической плотности, турбидиметрического или колориметрического эффекта питательных сред, происходящего под влиянием процессов роста и жизнедеятельности микроорганизмом в исследуемой пробе.

ГЛАВА 17 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

129. Глицериновая смесь.

Состав:

Натрий хлорид (Na Cl) (0,85% раствор)	1000 мл
Глицерин нейтральный	500 мл
Натрий гидрофосфат безводный (Na ₂ HPO ₄) 20 % раствор	150 мл

Приготовление: смешивают первые два ингредиента и добавляют раствор натрия гидрофосата в таком количестве, чтобы довести рН до 7,8-8,0, а затем разливают в пробирки или флаконы по 10 мл, стерилизуют в автоклаве при 112⁰ С в течение 15 мин или текучим паром 3 дня подряд. После стерилизации рН 7,6-7,8.

130. Фосфатно-буферная смесь.

Состав:

Калий дигидрофосфат (KH ₂ PO ₄)	0,45 г
Натрий гидрофосфат безводный (Na ₂ HPO ₄)	5,34 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Приготовление: ингредиенты смешивают, разливают по 10 мл в пробирки или флаконы, стерилизуют в автоклаве при 120⁰С 30 мин.

131. Изотонический раствор натрия хлорида.

Состав:

Натрий хлорид (Na Cl)	8,5 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Приготовление: соль растворяют при подогревании, фильтруют, устанавливают рН 7,0-7,2, разливают в пробирки по 5-7 мл, стерилизуют при 121⁰С 30 мин.

132. Селенитовая среда.

Состав:

Дистиллированная вода	1000 мл
Натрий кислый селенисто-кислый (NaHSeCb)	4 г
Пептон	5 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный, безводный (Na ₂ HPO ₄)	7г
Натрий фосфорнокислый однозамещенный (NaH ₂ PO ₄)	3 г
Лактоза (химически чистая)	4 г

Приготовление:

Раствор № 1. Для приготовления селенитовой среды необходима предварительная подтитровка ее составных частей так, чтобы рН > не был выше 7,0(6,9-7,1), что достигается путем изменения соотношения фосфатных солей. Причем подтитровка проводится всякий раз, когда меняется серия любого из входящих в среду основных ингредиентов (пептон, кислый селенисто-кислый натрий, фосфаты).

К приготовленному раствору фосфатных солей в воде (1000 мл) добавляют пептон и лактозу.

Разливают во флаконы по 50 мл и стерилизуют текучим паром в течение 2-х дней по 30 минут или при температуре 112⁰С в течение 30 минут.

Раствор № 2. Отдельно на стерильной дистиллированной воде готовят 10% раствор кислого селенисто-кислого натрия. Перед началом работы в каждый флакон с 50 мл раствора № 1 добавляют 2 мл 10% раствора кислого селенисто-кислого натрия.

Приготовленную среду разливают в стерильные пробирки по 5-7 мл и закрывают плотно пробками. Стерилизация готовой среды не допускается, так как при этом происходит редукция селенита натрия, выпадает красный осадок и среда становится непригодной. Раствор № 1 может храниться, в холодильнике в течение 1-2 месяцев.

133. Среда магниевая.

Раствор № 1:

Пептон	8,4 г
Хлористый натрий (NaCl)	14,3 г
Дрожжевой диализат	40,0 мл
Калий фосфорнокислый (KH ₂ PO ₄)	2,85 г
Вода дистиллированная	890,0 мл

Раствор № 2:

Хлористый магний кристаллический (MgCl ₂ .6H ₂ O)	71,4 г
Вода дистиллированная	90,0 мл

Раствор № 3:

0,5% водный раствор бриллиантового зеленого	1,8 мл
---	--------

После растворения всех ингредиентов растворы соединяют, разливают определенные объемы в колбы, флаконы или пробирки и стерилизуют при 112⁰С 30 минут.

Пропись предусматривает посе́вы равных объемов исследуемой жидкости и среды обогащения. При исследовании плотного материала в состав среды вводится двойное количество дистиллированной воды.

134. Среда Мюллера.

К 90 мл стерильного бульона Хоттингера добавляют: 4,5г мела, предварительно простерилизованного сухим жаром; 10 мл раствора натрия тиосульфата (50 г чистого кристаллического натрия тиосульфата в 100 мл дистиллированной воды стерилизуют текучим паром); 2 мл раствора Люголя (металлического йода 25 г, йодистого калия 20 г, дистиллированной воды 100 мл). Указанные ингредиенты смешивают, взбалтывают, разливают по пробиркам. Готовая среда стерилизации не подлежит.

135. Среда Кауфмана.

Состав:

Среда Мюллера (стерильная)	1000 мл
Стерильная бычья желчь	50 мл
0,1% водный раствор бриллиантового зеленого	10 мл

Перемешать, разлить в стерильные пробирки, не стерилизовать.

136. Тетратионатная среда (Мюллер-Кауфман).

136.1. Основа среды: в 100см³ мясо-пептонного бульона добавляют 4,5 г стерильного углекислого кальция. Стерилизуют при 121⁰С 20 минут. К 100см³ основы среды асептически прибавляют: 10см³ раствора гипосульфита натрия Na₂S₂O₃ · 5H₂O, 2см³ йодного раствора, 0,2 см³ раствора бриллиантового зеленого, 5см³ раствора желчи. Указанные растворы прибавляют к основе среды в приведенном выше порядке, перемешивая смесь после каждого прибавления. Среду допускается использовать в течение одной недели после приготовления.

136.2. Раствор гипосульфита натрия: 50,0г гипосульфита натрия помещают в колбу вместимостью 100см³, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки. Раствор переливают в колбу или флакон и стерилизуют текучим паром 30мин или при 121⁰С 20 минут.

136.3. Йодный раствор: 25,0г йодистого калия помещают в колбу, вместимостью 100см³ растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, прибавляют 20г кристаллического йода, растворяют, объем растворов доводят дистиллированной водой до метки, хранят в плотно закрытом темном сосуде.

136.4. Раствор бриллиантового зеленого: 0,5г бриллиантового зеленого переносят в фарфоровую ступку и постепенно растворяют в дистиллированной воде, раствор переливают в колбу вместимостью 100см³ и доводят дистиллированной водой до метки, хранят в плотно закрытом темном сосуде при комнатной температуре не более 3 месяцев.

136.5. Раствор желчи: 10,0г сухой желчи растворяют в 100см³ количестве дистиллированной воды, или используют натуральную желчь, стерилизуют при 121⁰С 20 минут.

137. Забуференная пептонная вода.

10,0г пептона, 5,0г хлористого натрия, 9,0г двузамещенного фосфарнокислого натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) 1,5г однозамещенного фосфарнокислого калия растворяют при нагревании в 1000cm^3 дистиллированной воды, устанавливают рН так, чтобы после стерилизации он составлял при 25°C $7,0+0,1$, стерилизуют при 121°C 20 мин.

138. Среда Рапопорт.

Состав:

Мясо-пептонный бульон	1000 мл
Стерильная бычья желчь	100мл
Глюкоза	20г
Раствор индикатора Андредэ	10мл

Разлить во флаконы с поплавками по 50 мл. Стерилизовать текущим паром три дня по 30 минут.

139. Трехсахарный агар с солями железа (TSI).

Состав:

Мясная вода	1000 мл
Дрожжевой экстракт жидкий	100 мл
или	
Дрожжевой экстракт по сухой массе	3 г
Пептон	20 г
Натрий хлорид (NaCl)	3,5 г
Агар	15 г
Железо (II) сульфат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), перекристаллизованное	0,2 г
Натрий тиосульфат ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,3 г
Глюкоза	1,0 г
Лактоза	10 г
Сахароза	10 г
Феноловый красный (0,2 % водный раствор)	12 мл

Приготовление: готовят основу, к мясной воде добавляют дрожжевой экстракт, пептон, натрия хлорид и агар. Смесь подогревают до расплавления агара, устанавливают рН $7,0-7,1$. Фильтруют, разливают во флаконы по 0,5 л, стерилизуют при 121°C 30 мин. К стерильной основе добавляют остальные ингредиенты, разливают асептично в пробирки по 6-7 мл, стерилизуют при 112°C 30 мин. Скашивают в горячем виде, так, чтобы оставить столбик высотой $2,5-3,0$ см.

140. Трехсахарный агар с мочевиной (среда Олькеницкого).

Состав:

Агар питательный сухой	25 г
Лактоза	10 г
Сахароза	10 г
Глюкоза	1 г
Аммоний-железо (II) сульфат ($\text{FeZO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,2 г
Натрий тиосульфат ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,3 г

Мочевина	10 г
Феноловый красный (0,4 % водный раствор)	4 мл
Вода дистиллированная	1000 мл

Соли предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Углеводы и мочевину растворяют таким же образом, но при подогревании в водяной бане. Сухой питательный агар расплавляют в остальной воде при нагревании на огне 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 мин. Скашивают, оставляя столбик 2-2¹/₂ см.

Готовая среда бледно-розового цвета.

141. Раппапорт-Вассилиадис соево-пептонный бульон (RVS).

141.1. Основа:

Соевый пептон	5г
Хлорид натрия	8г
КН ₂ РО ₄	1,4г
К ₂ НРО ₄	0,2г
Дистиллированная вода	1000мл

Нагреть содержимое до 80⁰С, до полного растворения ингредиентов. Раствор хранится один день.

141.2. Раствор хлорида магния:

Хлорид магния	400г
Дистиллированная вода	1000мл

Растворить хлорид магния в воде. Хранить в темной посуде при комнатной температуре в течение 2 часов.

141.3. Раствор малахитового зеленого:

Оксалат малахитового зеленого	0,4г
Дистиллированная вода	100мл

Растворить соль в воде хранить в темной посуде при комнатной температуре в течение 8 месяцев.

141.4. Состав среды:

Основа	1000мл
Раствор хлорида магния	100мл
Раствор малахитового зеленого	10мл

141.5. Смешать компоненты среды и разлить содержимое по 10мл в пробирки. Автоклавировать при 115⁰С в течение 15мин. Проверить рН, которое после стерилизации должна быть 5,2+0,2 при 25⁰С. Хранить при 4⁰С максимум 4 месяца.

142. Бриллиантовый-зеленый агар (BGA).

Состав:

Пептон	10г
Дрожжевой экстракт	3г
Хлорид натрия	5г
Лактоза	10г

Сахароза	10г
Феноловый красный	0,09г
Бриллиантовый зеленый	0,0047г
Агар	12г
Дистиллированная вода	1000мл

Все ингредиенты растворить в воде и нагреть содержимое в течение 1 мин. Проверить рН среды (6,7-7,1) и разлить в бутылки по 1000мл. Не автоклавировать.

143. Висмут - сульфитный агар с феноловым красным.

Состав:

Мясопептонный бульон	1000 мл
Натрий хлористый (NaCl)	20 г
Феноловый красный	0,02 г
Агар	15 г

Смешивают все ингредиенты и нагревают до кипения и полного растворения всех ингредиентов. Затем охлаждают до 50⁰С, устанавливают рН 8,6 и стерилизуют при 121⁰С - 15 минут. Охлаждают до 50⁰С и добавляют 100 мл раствора висмут-сульфита и 1 мл 95 % этилового спирта.

144. Раствор висмут-сульфита.

Растворяют 100 г сернисто-кислого натрия (Na₂SO₃) в 500 мл кипящей воды (1); 30 г аммоний-висмут лимоннокислого в 250 мл кипящей воды (2); 50 г сахарозы, 5 г маннита, 15 г бикарбоната натрия (NaHCO₃) в 300 мл кипящей воды (3). Растворы 1 и 2 смешивают и кипятят 1 минуту. Прибавляют раствор (3) и смешивают. Раствор хранят в холодильнике в течение 1 месяца.

145. Висмут-сульфит - солевой бульон

145.1. Состав:

Дистиллированная вода	950 мл
Пептон	10 г
Хлористый натрий (NaCl)	25 г
Хлористый калий (KCl)	0,7 г
Хлористый магний (MgCl ₂ -6H ₂ O)	5 г

145.2. Устанавливают рН 9,1 добавлением 10% водного раствора углекислой соды. Стерилизуют при 121⁰С 15 минут, охлаждают до комнатной температуры и добавляют асептично 100 мл раствора сернисто-кислого висмута и 1 мл этилового спирта 96°. Хорошо смешивают и разливают асептично в стерильные пробирки по 10 мл.

145.3. Приготовление раствора сернисто-кислого висмута.

Растворяют: 1) 20 г сернисто-кислого натрия (Na₂SO₃) в 100 мл кипящей воды; 2) 0,1 г аммоний-висмут лимоннокислого в 100 мл кипящей воды; 3) 20 г маннита в 100 мл кипящей воды. Смешивают растворы 1 и 2, кипятят, смесь в течение 1 минуты и добавляют раствор 3. Готовая смесь имеет белый цвет, мутная; перед использованием перемешать. Раствор можно хранить месяц в холодильнике.

146. Кровяной - солевой агар (среда Wagatsuma).

Состав:

Дрожжевой экстракт	5 г
Пептон	10 г
Натрий хлористый (Nad)	70 г
Манвит	5 г
Агар	15 г
0,1% кристалл-виолет	0,01 мл

Растворяют все ингредиенты в 1 литре дистиллированной воды и доводят рН до 7,5. Нагревают кипячением в течение нескольких минут до полного растворения всех ингредиентов. Не стерилизуют. Охлаждают до 50° и добавляют 10% отмытых человеческих эритроцитов. Все смешивают и разливают в чашки Петри.

147. Среда Никодемуса.

Состав:

2% питательный агар	1000 мл
Этиловый спирт	80 мл
Эмульсия двух желтков	

К расплавленному и охлажденному до 45-60°С агару добавляют этиловый спирт и после перемешивания эмульсию яичных желтков. Тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри, которые можно хранить в холодильнике не более 3 суток. Эмульсию яичных желтков готовят путем эмульгирования отделенных от белка 2 желтков в 10 мл стерильного физиологического раствора.

148. Среда Донована.

Состав:

Питательный агар	1000 мл
Трехзамещенный цитрат натрия	2,5 г
Хлористый литий (LiCe.H ₂ O)	2,5 г

Стерилизуют при 110°С 30 минут, охлаждают до 45-50°С и добавляют полимиксин «М» 200 000 ед. и эмульсию двух желтков.

Тщательно (перемешивают и разливают в чашки Петри, которые можно хранить в холодильнике не более 7-10 дней.

149. Солевой-полимиксиновый агар с 2, 3, 5-трифенил-тетразолий хлоридом (ТТХ).

Состав:

2% питательный агар	1000 мл
Хлористый натрий (NaCl)	60 г
Полимиксин «М»	200 000-400 000 ед
2, 3, 5 - трифенилтетразолий хлорид	0,1—0,2 г
Эмульсия двух желтков	

В агар после расплавления и охлаждения до 46-50°С добавляют полимиксин, 2, 3, 5-ТТХ и эмульсию желтков, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри, которые можно хранить в холодильнике не более 7-10 дней.

150. Желточно-солевой агар (ЖСА).

В качестве основы используют селективный солевой агар для стафилококков. По прописи, указанной на этикетке, готовят агар. К расплавленному и охлажденному до 45-50⁰С агару добавляют 20 % желточной взвеси (асептически извлеченный из яйца желток взбалтывают с 200 мл изотонического раствора хлорида натрия). Смешивают агар с желточной взвесью, разливают по 20 мл в чашки Петри. Хранят в холодильнике в течение 2-х недель.

151. Молочно-солевой агар.

К расплавленному и охлажденному до 45-50⁰С солевому агару добавляют 10 % стерильного обезжиренного молока, смешивают и разливают среду в чашки Петри. Хранят в холодильнике не более 2-3-х дней.

152. Солевой бульон.

6,0 г хлористого натрия растворяют в 100 см³ мясо-пептонного бульона, устанавливают рН так, чтобы после стерилизации он составлял при 25⁰С 6,9+1. Бульон разливают в колбы или пробирки и стерилизуют при (121+1)⁰С в течение 15 мин.

153. Сахарный бульон.

1,0 г глюкозы растворяют в 100 см³ мясо-пептонного бульона, устанавливают р Н так, чтобы после стерилизации он составлял при 25⁰С 6,9+1. Бульон разливают в колбы или пробирки и стерилизуют при (121+1)⁰С в течение 15 мин.

154. Среда с ДНК.

6,1 г трисаминаметана растворяют в 1000 см³ дистиллированной воды, доводят рН раствора до (9,0+0,1). К раствору добавляют 0,3 г ДНК, 10 г хлористого натрия, 1,1 см³ раствора хлористого кальция концентрации 1 г/дм³, 15 г агара, нагревают до полного расплавления агара. К охлажденной до 55-65⁰С среде добавляют 9,2 см³ раствора толуидина синего (1,0 г толуидина синего «С» растворяют в 100 см³ дистиллированной воды) перемешивают и разливают по чашкам Петри. Хранить среду при температуре (6,0+2,0)⁰С не более 7 суток

155. Кристалл-виолет-азид-кровяной агар (среда Пейкера).

Состав:

а) основной агар:

мясо-пептонный бульон	1000 мл
хлористый натрий (NaCl)	5 г
агар-агар	15 г

б) 0,05% водный раствор кристалл-виолета

в) 5,0% водный раствор азиды натрия (NaN₃)

г) цитратная или дефибринированная кровь кролика или человека.

Части «а» и «б» стерилизуют при 12⁰С в течение 20 минут, часть «в» стерилизуют текучим паром 30 минут.

Для приготовления среды берут стерильно:

основного агара расплавленного и охлажденного до 45 ⁰ С	100 мл
0,05% водного раствора кристал-виолета	0,4 мл

5,0% водного раствора азиды натрия	1 мл
цитратной или дефибринированной крови	5 мл

Все тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Чашки со средой можно хранить в холодильнике не более 7 дней.

156. Молочная среда с полимиксином (среда Калины).

Состав:

Расплавленный и охлажденный до 46 ⁰ С основной агар (как в среде Пейкера)	85 мл
01% водный раствор кристалливиолета	125мл
10% водный раствор 2, 3, 5-ТТХ	0,5 мл
Стерильное обезжиренное молоко	15 мл
Полимиксин «М»	20000-40000 ед

Все ингредиенты смешивают асептично и среду тонким слоем разливают в чашки Петри. Чашки со средой можно хранить в холодильнике 7-10 дней.

157. Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда (ЭДДС).

Состав:

Сухой питательный агар	35 г
Автолизат дрожжевой	20 мл
Глюкоза	10 г
Дистиллированная вода	800 мл

Расплавляют при нагревании, профильтровывают, стерилизуют при 112⁰С 15 мин, рН 7,2-7,4. Перед разливкой в чашки, в питательную среду добавляют ТТХ 0,1 г водного раствора кристаллического фиолетового 0,01 % 12,5 мл, налидиксовой кислоты 0,1 г, стерильного обезжиренного молока подогретого до 45⁰С 200 мл, свежей дефибринированной крови (животного или человека) 50 мл. Содержимое размешивают и разливают по чашкам по 7 мл.

158. Сахарно-дрожжевой питательный агар.

Состав:

Сухой питательный агар	35 г
Дрожжевой автолизат	20 мл
Глюкоза	10 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Расплавляют при нагревании, стерилизуют среду при 112⁰С 15 мин, рН 7,2-7,4.

159. Сахарно-дрожжевой питательный агар с теллуридом калия.

Состав:

Сухой питательный агар	35 г
Дрожжевой автолизат	20 мл
Глюкоза	10 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Приготовленную смесь расплавляют при нагревании, добавляют лимоннокислого натрия 5,0 г.

Стерилизуют среду при 112⁰С 15 мин, рН 7,2-7,4. Перед разливкой среды в стерильные чашки добавляют 50 мл лошадиной сыворотки, 0,1 г налидиксовой

кислоты и 0,7 г (35 мл 2 % водного раствора) теллурита калия, тщательно размешивают.

160. Желчно-щелочной агар.

Компоненты, рассчитанные на 1000 мл сахарно-дрожжевого питательного агара, растворяют в 600 мл дистиллированной воды, вносят 400 мл медицинской желчи. Перед разливкой в чашки добавляют 50 мл крови человека, или животного, 12,5 мл 0,01 % раствора кристаллического фиолетового и 20 мл 10% раствора КОН.

161. Питательный бульон с глюкозой.

К100 мл питательного бульона, рН 7,2-7,4 прибавляют 0,2 г глюкозы. Среду стерилизуют однократно 15 мин при 0,5 атм.

162. Среда с 2, 3, 5 — трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ).

Состав:

Мясопептонный бульон	100 мл
Дрожжевой экстракт	2 мл
Хлористый натрий (NaCl)	0,5 г
Агар-агар	1,5 г
Глюкоза	1 г
2, 3, 5-ТТХ	0,01 г

Все ингредиенты, кроме ТТХ, автоклавируют при 121⁰С 10-12 мин. 2, 3, 5- ТТХ растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, стерилизуют текущим паром в течение 30 мин.

163. Среда с молоком.

Состав:

мясопептонный бульон	80 мл
молоко (стерильное)	20 мл
глюкоза	0,2 г
агар-агар	1,5 г

Стерилизуют при 121⁰С в течение 10-12 мин. Среда в чашках Петри хранится в холодильнике не более 7-10 дней. Стерильное молоко добавляют в среду перед разливкой в чашки Петри.

164. Среда Китт-Тароцци.

Стерильные пробирки заполняют на 1-1,5 см кусочками печени, мяса или рыбы и заливают приготовленным мясо-пептонным бульоном с глюкозой и агаром. В 1 дм³ мясо-пептонного, рыбо-пептонного или печеночного бульона вносят 10 г глюкозы и 1,5 г агара, при нагревании постепенно расплавляют и стерилизуют при (121+1) ⁰С, рН проверяют до и после стерилизации (7,1+0,1). При приготовлении среды впрок вместо добавления к ней агара на поверхность среды перед стерилизацией в пробирки наслаивают 0,5-1 см вазелинового масла. При применении среды Китт-Тароцци без добавления в нее агара или вазелинового масла на поверхность среды после посева наслаивают голодный агар или парафиновую

смесь высотой 1-1,5 см. При посевах свежеприготовленную среду Китт-Тароцци (не более 3-х суток с момента приготовления) добавлять агар, вазелиновое масло или наслаивать на ее поверхность голодный агар не обязательно.

165. Печеночно-глицериновая среда.

К 1 дм³ печеночного бульона добавляют 5 г глицерина, 5 г глюкозы, разливают в пробирки или флаконы с кусочками печени (20-30 г печени на 100см³), устанавливают рН (7,0+0,1) и стерилизуют при (121+1)⁰С - 20 мин.

166. Бульон триптиказо-пептонно-глюкозный с дрожжевым экстрактом и трипсином.

50 г триптического перевара казеина, 5,0 г пептона, 100 см³ дрожжевого экстракта, 4,0 г глюкозы, 1,0 г тиогликолята натрия добавляют к 900 см³ дистиллированной воды, устанавливают рН (7,0+0,1) и стерилизуют при (121+1)⁰С пробирки – 10 мин, флаконы – 15 мин. Хранят при комнатной температуре не более 7 суток. Применяют для культивирования *S. Botulinum*, образующих прототоксин, перед употреблением к 1000 см³ бульона добавляют 60 см³ 1,5 %-ного раствора трипсина в фосфатно-буферном растворе.

167. Среда Вильсон-Блер, измененная для анаэробов.

Раствор железоаммонийных квасцов концентрации 50 г /дм³ и раствор сернисто-кислого натрия с массовой концентрацией 200 г/дм³ готовят на стерильной дистиллированной воде, extempore. Раствор сернисто-кислого натрия стерилизуют текучим паром в течение 1 часа. К 100 см³ расплавленного и охлажденного до 80⁰С мясо-пептонного агара концентрации глюкозы 10 г/дм³ добавляют 10 см³ раствора сернисто-кислого натрия и 1 см³ раствора железоаммонийных квасцов. Устанавливают рН 7,5-7,8.

168. Лакмусовое молоко.

К стерильному молоку добавляют лакмусовую настойку до получения сиреневого окрашивания (на 100 см³ молока – 1 см³ лакмусовой настойки). Лакмусовое молоко разливают по стерильным пробиркам высоким столбиком, кипятят на водяной бане 15-20 мин и охлаждают для посева до 45⁰С.

169. Питательные среды для выделения и идентификации кампилобактерий.

169.1. Транспортная среда Кэрри-Блер.

Растворить в 991мл дистиллированной воды при нагревании на водяной бане следующие ингредиенты: натрия тиогликолят – 1,5г, натрия фосфат двузамещенный – 1,1г, натрия хлорид -5г, агар-агар – 1,6г. При исследовании материала методом мембранных или ядерных фильтров количество агара-агара необходимо уменьшить до 0,4-0,5г. В охлажденную до 40-45⁰С основу добавить 9мл свежеприготовленного 1% раствора кальция хлорида. Установить рН 8,4. Разлить по 10-12 мл в стерильные центрифужные пробирки, стерилизовать 120⁰С 30мин.

169.2. Транспортная среда Амиеса.

Состав:

Уголь активированный	10г
Натрия хлорид	3г

Na ₂ HPO ₄	1,15г
KH ₂ PO ₄	0,2г
KCl	0,2г
CaCl ₂	0,1г
MgCl ₂	0,1г
Натрия тиогликолят	1г
Агар-агар	4г
Вода дистиллированная	1л

Разлить по пробиркам и стерилизовать 121⁰С 15мин.

169.3. Среда Preston для выделения кампилобактерий из молока.

Состав:

Питательный бульон с 5% лизированных эритроцитов лошади	
Полиммиксин В	5МЕ/мл
Рифампицин	10мг/л
Триметоприм	10мг/л
Циклогексимид	0,1г/л

169.4. Среда Парка для исследования продуктов птицеводства.

Состав:

Бульон для бруцелл с 7% лизированной лошадиной крови	
ФВР – добавка	
Ванкомицин	20мг/л
Триметоприм	10мг/л
Полиммиксин В	500МЕ/л

169.5. Добавка для повышения аэротолерантности (ФВР – добавка).

Состав:

Железа сульфат II	0,25г
Натрия метабисульфит	0,25г
Натрия пируват	0,25г

Навески солей внести в сухую стерильную пробирку, добавить 5 мл стерильной дистиллированной воды. Указанное количество добавок рассчитано на 1л питательной среды. Растворение солей занимает 15-20мин при периодическом встряхивании пробирки. Правильно приготовленный раствор имеет оливковый цвет. Раствор не подлежит хранению и должен быть использован в день приготовления.

169.6. Кровяной эритрит-агар.

40г эритрит-агара размешать в 1л дистиллированной воды, довести до кипения и кипятить до полного растворения 2-3мин. Среду разлить по 400мл, стерилизовать 121⁰С 20мин. В остуженную до 50-55⁰С питательную основу внести ФВР-добавку и 20 мл бараньей, лошадиной или донорской крови. Для придания селективных свойств возможно использовать одну из приведенных ниже селективных смесей.

169.7. Кровяные добавки.

Баранью или лошадиную кровь, асептически взятую у здоровых животных, дефибринировать с помощью стеклянных бус и хранить до использования при 4⁰С в течение 7-10 дней.

169.8. Смесь антибиотиков.

169.8.1. Смесь антибиотиков 1.

Ванкомицин	2,0 мг
Полимиксин	0,05 мг
Триметоприм	1,0мг
на 200 мл среды	

169.8.2. Смесь антибиотиков 2.

Цефоперазон	32,0 мг
Ванкомицин	10,0 мг
Амфотерицин В	3,0 мг

на 1000мл среды

Необходимые количества антибиотиков взвесить на весах и внести во флакон с 3,0 мл дистиллированной воды; смесь растворить при тщательном перемешивании.

169.9. Угольный эритрит-агар.

Состав:

Эритрит-агар	36г
Железо II сернокислое	0,15г
Экстракт кормовых дрожжей (ЭКД)	4г
Уголь бактериологический активированный	4г
Вода дистиллированная	4г

Стерилизовать автоклавированием 121⁰С 15мин.

170. Агар Эндо, агар с эозин-метиленовым синим (ЭМС-агар), агар Плоскирева, висмут-сульфит агар, трехсахарный агар с солями железа, (TSI), среда Кесслера, энтерококкагар, азидный агар с эскулином и желчью, энтерококкагар, среда Клиглера, среда Олькеницкого, SS-агар (сальмонелла-шигелла агар), XLD агар (ксилозо-лизин-дезоксихолатный), TCBS-агар (тиосульфат-цитрат-желчно-сахарозный агар), среда для контроля стерильности (тиогликолиевая среда), селенитовый бульон, питательная среда для накопления сальмонелл – магниевая среда, среда Левина, основа агара Байэрд-Паркера, транспортная среда Амиеса с активированным углем, основа тетрационатного бульона, эритритагар – сухие промышленные питательные среды, состав и способ приготовления указаны на этикетке.

171. Допускается использование других коммерческих питательных сред, систем идентификации и диагностических препаратов, предназначенных для целей описываемых методов зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. При их применении руководствоваться рекомендациями производителя.

Приложение 1
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Дифференциальные характеристики видов и подвидов сальмонелл

Род	Salmonella						
Вид	S. enterica						S. bongori
Подвид	enterica I	salamae II	arizonae IIIa	diarizonae IIIb	houtenae IV	indica VI	V
Свойства							
Дульцит	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 ч)	-	-	+	+	-	d	+
Малонат	-	+	+	+	-	-	-
Желатиназа	-	+	+	+	+	+	-
Сорбит	+	+	+	+	+	-	+
Рост с KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+) тартрат*	+	-	-	-	-	-	-
Галактуронат	-	+	-	+	+	+	+
γ-глутамил-трансфераза	+ **	+	-	+	+	+	+
β - глюко-нидаза	d	d	-	+	-	d	-
Мукаг	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Салицин	-	-	-	-	+	-	-
Лактоза	-	-	+(75%)	+(75%)	-	d	-
Лизис:фаг 01	+	+	-	+	-	+	d
Обычная среда обитания	Теплокровные животные		Холоднокровные животные и окружающая среда				

Примечание: * или D-тартрат; ** Thyphimurium, Dublin -; d= различные результаты, получаемые от различных штаммов; + = 90% или более положительных реакций;- = 90% или более отрицательных реакций

Приложение 2
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Биохимические свойства бактерий рода *Salmonella*

Тесты или субстраты	Реакция	Тесты или субстраты	Реакция
1	2	1	2
Адонит	-	Сероводород	+, -
Арабиноза	+, (+)	Мочевина (гидролиз)	-
Глицерин (по Штерну)	x	Желатин (22 °С)	x
Глюкоза (газ)	+, -	Фенилаланиндезаминаза	-
Дульцит	x	Лизиндекарбоксилаза	+, -
Инозит	x	Аргининдекарбоксилаза	+, (+)
Ксилоза	x	Орнитиндекарбоксилаза	+
Лактоза	x	Глутаминовая кислота	-
Мальтоза	+	Цитрат Симонса	+, -
Маннит	+	Цитрат Кристенсена	x
Рамноза	+	Восстановление нитратов	+
Салицин	-	Ацетат	x
Сахароза	-	Малонат	x
Сорбит	+	Мукат	x
Трегалоза	+	D-Тартрат	+, (-)
Реакция с метиловым красным	+	I-Тартрат	x
Реакция Фогес-Проскауэра	-	L-Тартрат	x
Индол	-	β-Галактозидаза	+
		KCN	x
		Подвижность	+, -

Примечание:- отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения у 90% штаммов или более; + положительная реакция через 18-24 ч у 90% штаммов или более; +, (+) чаще положительная, реже замедленно положительная у 90% штаммов или более; x – различные результаты реакции; +, - чаще положительная, реже отрицательная реакция у 90% штаммов и более; +, (-) чаще положительная, реже замедленно отрицательная реакция у 90% штаммов и более.

Приложение 3
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Сокращенная схема Кауфмана-Уайта 2001

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

O:8 (C ₂ -C ₃)	27	S.Newport	6,8, <u>20</u>	e,h	z,2:[z ₆₇]
	28	S.Bovismorbificans	6,8, <u>20</u>	r,[i]	1,5
	29	S.Glostrup	6,8	z ₁₀	e, n, z ₁₅
	30	S.Muenchen	6,8	d	1,2:[z ₆₇]
	31	S.Kentucky	8, <u>20</u>	i	z ₆
	32	S.Chailey	6,8	z ₄ ,z ₂₃	[e,n,z ₁₅]
	33	S.Sandow	6,8	f,g	e,n,z ₁₅
O:9 (D ₁)	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 ₄)	44	S.London	3,10[<u>15</u>]	l,v	1,6
	45	S.Anatum	3,10[<u>15</u>] [<u>15</u> , <u>34</u>]	e,h	1,6
	46	S.Lexington	3,10[<u>15</u>] [<u>15</u> , <u>34</u>]	z ₁₀	1,5
	47	S.Weltevreden	3,10[<u>15</u>]	r	z ₆
	48	S.Meleagridis	3,10[<u>15</u>] [<u>15</u> , <u>34</u>]	e,h	l,w
	49	S.Give	3,10[<u>15</u>] [<u>15</u> , <u>34</u>]	[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> , <u>34</u>]	e,h	1,5
	52	S.Nyborg	3,10[<u>15</u>]	e,h	1,7
O:1,3,19 (E ₄)	53	S.Senftenberg	1,3,19	g,[s],t	-
O:11 (F)	54	S.Aberdeen	11	i	1,2
	55	S.Rubislaw	11	r	e,n,x
O:13 (G)	56	S.Worthington	<u>1</u> ,13,23	z	l,w
	57	S.Poona	<u>1</u> ,13,22	z	1,6:[z ₄₄]
O:6,14 (H)	58	S.Carrau	6,14,[<u>24</u>]	y	1,7
	59	S. Onderstepoort	1,6,14,[<u>25</u>]	e,h	1,5
	60	S.Buzu	[1],6,14,[<u>25</u>]	i	1,7
O:16 (I)	61	S.Hvitvingfoss	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 ₁₅
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 ₄ ,Z ₂₃	[e,n,Z ₁₅]
O:42 (T)	73	S.Weslaco	42	Z ₃₆	-
O:43 (U)	74	S.Ahuza	43	k	1,5
O:44 (V)	75	S.Niarembe	44	a	l,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 ₁₅
O:50 (Z)	79	S.II 50	50	z	e,n,x
O:52	80	S.Utrecht	52	d	1,5
O:53	81	S.II 53	53	Z ₄ ,Z ₂₄	-
O:54	82	S.Uccle	3,54	g,s,t	-
O:55	83	S.II 55	55	k	Z ₃₉
O:57	84	S.II 57	57:	Z ₂₉ :	Z ₄₂
O:58	85	S.II 58	58	l,Z ₁₃ ,Z ₂₈	1,5
O:59	86	S.II 59	59	k	[Z ₆₅]
O:60	87	S.II 60	60	z:	e,n,x
O:61	88	S. IIIb 61	61	i	z
O:62	89	S. IIIa 62	62	Z ₄ ,Z ₃₂	-
O:63	90	S. IIIa 63	63	g,Z ₅₁	-
O:65	91	S. IIIb 65	65	Z ₁₀	e,n,x,Z ₁₅
O:66	92	S.V 66	66	Z ₃₅	-
O:67	93	S.Crossness	67	r	1,2

Приложение 4

к Инструкции 4.2.10-15-21-2006

«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Дифференциация родов семейства Enterobacteriaceae
по биохимическим свойствам

	Тест или субстрат	Escherichia	Shigella	Salmonella	Citrobacter	Klebsiella	Enterobacter	Hafnia	Serratia	Proteus	Yersinia	Edwardsiella	Erwinia
Комби- ниро- ванная среда	Сероводород	-	-	+, -	+, -	-	-	-	-	+, -	-	+	-, +
	Лактоза*	+, -	-	-, +	x	+	+	-, +	-, +	-	-	-	x
	Глюкоза (газ)*	+, -	-	+, -	+	+	+	+, -	-, +	+, -	-	+	-
	Мочевина	-	-	-	x	-	(+), -	-	x	+, -	+, (+)	-	-
Мини- мальный диффе- ренци- рующий ряд	Мочевина (по Преусу или Кристенсе- ну)**	-	-	-	x	(+)	(+), -	-	x	+, -	+	-	-
	Подвижность	+, -	-	+, -	+	-	+	x	+	+, -	-	+	+, -
	Индол	+, -	-, +	-	-, +	+, -	-	-	-	+, -	-, +	+	-
	Фенилаланин- дезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	x
	Цитрат Си- монса	-	-	+, -	+	+	+	x	+	x	-	-	+
	Ацетат натрия	+, (+)	-	x	x	+	+	-, (+)	x	x	x	x	x
	Лизиндекар- боксилаза	+, -	-	+, -	-	+	+, +	+	+	-	-	+	-
	Орнитинде- карбоксила- за	x	-, +	+	x	-	+	+	+	-, +	x	+	-
	Среда Кларка: реакция с ме- тиловым синим	+	+	+	+	-, +	-	+	x	+	+	+	-
	реакция Фогес- Проскауэра	-	-	-	-	+, -	+	x	x	-	-	-	x
	Сорбит	x	x	+	+	+	+	-	+	-, +	x	-	x

Примечание:

- отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения у 90% штаммов или более;

+ положительная реакция через 18-24 ч у 90% штаммов или более;

(+) замедленно (позже 24 ч) положительная реакция у 90% штаммов или более;

+, (+) чаще положительная, реже замедленно положительная у 90% штаммов или более;

-, + чаще отрицательная, реже положительная реакция у 90% штаммов и более;

+, - чаще положительная, реже отрицательная реакция у 90% штаммов и более;

(+), + чаще замедленно положительная, реже положительная реакция у 90% штаммов и более;

-, (+) чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция у 90% штаммов и более;

(+), - чаще замедленно положительная, реже отрицательная реакция у 90% штаммов и более;

x – различные результаты реакции;

* при получении на комбинированной среде не четких результатов эти тесты повторяют на отдельных средах (жидкие или полужидкие среды с лактозой, глюкозой);

** среду используют для дифференциации слабо гидролизующих мочевины энтеробактерий (в среде Олькеницкого).

Приложение 5
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Основные дифференциальные признаки сальмонелл
и сходных энтеробактерий

Тесты или субстраты	Роды						
	Salmonella	Citrobacter	Proteus	Klebsiella	Hafnia	Serratia	Enterobacter
β- Галактозидаза	+	+	-	+	+	+	+
Индол	-	X	X	X	-	-	-
Сероводород	+, -	+, -	+, -	-	-	-	-
Гидролиз мочевины	-	+, (-)	X	(+)	-	X	X
Рост в присутствии KCN	X	+	+	+	+	-	+
Лизиндекарбоксилаза	+	-	-	X	+	+	+
Цитрат	+	+		X	+	+	+
Малонат	X	X	-	+	X	-	+, -
Мукат	X	+		X	-	-	X
D-Тартрат	X	+		X	-		-
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	-	-	X	X	X	+
Гидролиз желатина	X	-	X	X	-	+	-, (+)
Фенилаланин	-	-	+	-	-	-	-

Примечание: - отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения у 90% штаммов или более; + положительная реакция через 18-24 ч у 90% штаммов или более; +, (+) чаще положительная, реже замедленно положительная у 90% штаммов или более; x – различные результаты реакции; +, - чаще положительная, реже отрицательная реакция у 90% штаммов и более; +, (-) чаще положительная, реже замедленно отрицательная реакция у 90% штаммов и более.

Приложение 6
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Биохимические свойства сальмонелл

Тест	Положительный или отрицательный результат	% штаммов сальмонелл дающих результат
Глюкоза (кислотообразование)	+	100
Глюкоза (газообразование)	+	91,9
Лактоза	-	99,2
Сахароза	-	99,5
H ₂ S	+	91,6
Расщепление мочевины	-	99,0
Лизиндекарбоксилаза	+	94,6
β – галактозидаза	-	98,4
Фогес-Проскауэр	-	100
Индолообразование	-	98,9

Приложение 7
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

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:6,7,8...
			3d	III:3,4,6...
			3c	III:6...
		4	4a	IV:3,4...
			4d	IV:6...
			5	*
	6	-	VI:-...	
	X-variant	-	- :7,8...	
	Y- variant	-	- :3,4...	
C	<i>S. boydii</i>	1-18	-	
D	<i>S. sonnei</i>	-	-	

Примечание: * *S. flexneri* 5 встречается в виде двух подсероваров: 5a (V:4) и 5b (V:7).

Приложение 8
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Биохимические свойства бактерий рода *Shigella*

Тесты или субстраты	Реакция	Тесты или субстраты	Реакция
1	2	1	2
Адонит	-	Реакция Фогеса-Проскауэра	-
Арабиноза	x	Индол	-, +
Глицерин	x	Сероводород	-
Глюкоза (газ)	-, +	Мочевина (гидролиз)	-
Дульцит	x	Желатин (22 °С)	-
Инозит	-	Фенилаланиндезаминаза	-
Ксилоза	x	Лизиндекарбоксилаза	-
Лактоза	-, (+)	Аргининдекарбоксилаза	x
Мальтоза	x	Орнитиндекарбоксилаза	-, +
Маннит	+, -	Цитрат Симонса	-
Рамноза	x	Цитрат Кристенсена	-
Рафиноза	x	Ацетат	-
Салицин	-	Малонат	-
Сахароза	-	Мукат	-
Сорбит	x	D-Тартрат	-
Трегалоза	x	β-Галактозидаза	-, +
Целлобиоза	-	KCN	-
Реакция с метиловым красным	+	Подвижность	-

Примечание: - отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения у 90% штаммов или более; + положительная реакция через 18-24 ч у 90% штаммов или более; x – различные результаты реакции; -, + чаще отрицательная, реже положительная реакция у 90% штаммов и более; +, - чаще положительная, реже отрицательная реакция у 90% штаммов и более; -, (+) чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция у 90% штаммов и более.

Приложение 9
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Биохимические свойства шигелл различных видов

Тест или субстрат	Реакция				
	S. dysenteriae	S. flexneri		S. boydii	S. sonnei
		серовары 1-5	серовар 6		
Глюкоза (газ)	-	-	-, +	-	-
Лактоза	-	-	-	-	(+)
Маннит	-	+	+, -	+	+
Сахароза	-	-	-	-	(+)
Дульцит	-, +	-	x	x	-
Сорбит	x	x	(+), +	x	-
Арабиноза	x	x	x	+	+
Рафиноза	-	x	-	-	x
Рамноза	x	x	-	-	+, (+)
Мальтоза	x	x	(+), +	x	+, (+)
Ксилоза	x	-	x	x	x
Трегалоза	+, (+)	+, (+)	(+), +	+, (+)	+
Целлобиоза	-	-	-	-	x
Глицерин	x	-	+, (+)	x	x
Индол	-, +	-, +	-	-, +	-
Аргининдекарбоксилаза	x	-	x	x	-
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-	+
Мукат	-	-	-	-	-, +
β-Галактозидаза	-, +	-	-	-, +	+

Примечание: - отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения у 90% штаммов или более; + положительная реакция через 18-24 ч у 90% штаммов или более; (+) замедленно (позже 24 ч) положительная реакция у 90% штаммов или более; +, (+) чаще положительная, реже замедленно положительная у 90% штаммов или более; x – различные результаты реакции; -, + чаще отрицательная, реже положительная реакция у 90% штаммов и более; +, - чаще положительная, реже отрицательная реакция у 90% штаммов и более; (+), + чаще замедленно положительная, реже положительная реакция у 90% штаммов и более; -, (+) чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция у 90% штаммов и более; (+), - чаще замедленно положительная, реже отрицательная реакция у 90% штаммов и более.

Приложение 10
к Инструкции 4.2.10-51-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Схема определения биоваров *S. sonnei*

Биовар	Ферментация углеводов		
	рамноза	ксилоза	мальтоза
Ia	+ (1)	-	+ (1-2)
Ib	+ (1)	-	+ (>2)
IIg	+ (>1)	-	+ (1-2)
IIe	+ (>1)	-	+ (>2)
III d	+ (1)	+ (1)	+ (1-2)
III c	+ (1)	+ (1)	+ (>2)
Ivf	+ (1)	+ (2 и позже)	+ (1 и позже)

Примечание: Условные обозначения: + ферментация (в скобках указаны сроки ферментации в днях); - отсутствие ферментации.

Приложение 11
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

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

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

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

Приложение 12

к Инструкции 4.2.10-15-21-2006

«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

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: + ферментация с образованием кислоты; ++ ферментация с образованием кислоты и газа; - отсутствие ферментации; (+) замедленная ферментация.

Приложение 13

к Инструкции 4.2.10-15-21-2006

«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Биовары *S. boydii*

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

Примечание: + ферментация с образованием кислоты; - отсутствие ферментации.

Приложение 14
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Основные биохимические свойства *E. coli*

Текст или субстрат	Результат реакции	Текст или субстрат	Результат реакции
Цитрат Симонса	-	Аргининдегидролаза	X
Мочевина	-	Адонит	-, +
Малонат натрия	-	Арабиноза	X
Сероводород	-	Глюкоза (газ)	+, -
Фенилаланиндезаминаза	-	Дульцит	X
Ацетат натрия	+, (+)	Инозит	-, +
Подвижность	+, -	Ксилоза	X
Индол	+, -	Лактоза	X
Лизиндекарбоксилаза	X	Манит	+
Реакция с метиловым красным	+	Мальтоза	X
Реакция Фогес-Проскауэра	-	Рамноза	X
Цитрат Кристенсена	X	Раффиноза	X
Желатин	X	Сацилин	X
Орнитиндекарбоксилаза	X	Сахароза	X
		Сорбит	X

Примечание: + положительная реакция через 18-24 ч у 90 % штаммов или более; - отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения у 90 % штаммов или более; +, (+) чаще положительная, реже замедленно положительная реакция у 90 % штаммов или более; +, - чаще положительная, реже отрицательная реакция у 90 % штаммов или более; X различные варианты реакции; -, + чаще отрицательная, реже положительная у 90 % штаммов или более.

Приложение 15
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

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

Поражения	Серогруппы		
	O-Ar	H-Ar	K-Ar
Кишечные			
Энтеротоксигенные	O6, O8, O11, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O114, O115, O126, O128ac, O139, O148, O153, O159, O166, O167	H4, H7, H9, H11, H12, H19, H20, H21, H28, H40	—
Энтеропатогенные	O18, O26, O44, O55, O86, O111ab, O112, O114, O119, O125ac, O127, O128 ab, O142, O158	H2, H6, H7, H11, H12, H14, H18	—
Энтероинвазивные	O28ac, O29, O112ac, O115, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O146, O167	—	—
Энтерогеморрагические	O26, O111, O157	H6, H7, H8, H11	—

Примечание: - антиген отсутствует, либо не обнаружен.

Приложение 16
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Антигенно-диагностическая схема сероваров *E. coli*,
наиболее часто вызывающих кишечные инфекции

№ п/п	ОК- группа	Н- антигены, определяющие серовары
1	O18ac:K77	1,4,7,8,10,12,16,26,30,32
2	O20:K84	9,10,19,25,26,34
3	O25:K11	6,12,30
4	O26:K60	2,6,7,8,9,10,11,12,14,16,18,19,27,30,32,33,46
5	O33:K	2,6,7,10,11,21,25
6	O44:K74	4,12,18,32,34
7	O55: K59	1,2,4,6,7,8,10,11,12,19,21,25,27,32,33,34,39
8	O75:K	9
9	O86a:K61	2,6,7,8,9,10,11,12,18,21,26,27,34,47
10	O112ac:K66	Н-*
11	O111ab:K58	2,4,6,7,11,12,16,20,21,25,27,30,32,34,40, «635»
12	O114:K90	4,10,21,32,
13	O119:K69	1,2,4,5,6,8,9,11,18,25,27,32,39,40
14	O124:K72	2,16,19,30,32,38,12
15	O125:K70	2,4,6,7,10,11,12,15,19,21,25,30,32,40
16	O126:K71	2,5,7,9,10,11,12,19,20,21,25,27,29,30,33,34,45
17	O127:K63	1,4,5,6,9,11,19,21,26,27,33,40, «635»
18	O128:K67**	2,6,7,8,9,10,11,12,16,19,21,27,35
19	O142:K86	6,18,38
20	O143:K	12
21	O144:K	4,Н-*
22	O151:K-	10,11
23	«408»	10,12

Примечание: *неподвижные штаммы (Н-) могут быть в каждой серогруппе и являются самостоятельным сероваром.

**Объединены обе разновидности-O128ab:K67 и O128ac:K67.

Приложение 17
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Биохимическая дифференциация *Proteus*, *Providencia* и *Morganella morganii*

Тест	Proteus				Morganella morganii	Providencia				
	mirabilis	muchofaciens	penneri	vulgaris		alcalifaciens	heimbachae	rettgeri	rustigianii	stuartii
Образование индола	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Реакция Фогес-Проскуэра	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Цитрат (среда Симмонса)	d	+	-	[-]	-	+	-	+	[-]	+
Образование H ₂ S	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-
Гидролиз мочевины	+	+	+	+	+	-	-	+	-	d
Орнитиндекарбоксилаза	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Гидролиз желатины	+	+	d	+	-	-	-	-	-	-
Образование газа из D-глюкозы	+	+	d	[+]	+	[+]	-	-	d	-
Образование кислоты из:										
D-адонитола	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
D-арабитола	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Глицерола	d	+	d	d		[-]	-	d	-	d
Мио-изонитола	-	-	-	-	-	-	d	+	-	+
Мальтозы	-	+	+	+			d			
D-маннозы	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
α-метил- D-глюкозида	-	+	[+]	d	-	-	-	-	-	-
L-рамнозы	-	-	-	-	-	-	+		-	-
Сахарозы	[-]	+	+	+	-	[-]	-	[-]	d	d
Трегалозы	+	+	d	d	-	-	-	-	-	
D-ксилозы	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Дезоксирибонуклеаза	d	+	d	[+]	-	-	-	-	-	-
Липаза	+	+	d	[+]	-	-	-	-	-	-
Просветление среды с тирозином	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Роение	+	+	d	+	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» 0-10% - штаммов положительные;
[-] - 11-25% - штаммов положительные;
d - 25-75% - штаммов положительные;
[+] - 76-89% - штаммов положительные;
«+» 90- 100% - штаммов положительные.

Приложение 18
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделе-
ния и идентификации возбудителей при
бактериальных пищевых отравлениях»

Сокращенная антигенно-диагностическая схема *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*

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

Приложение 19
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Дифференциация *Providencia rettgeri* на биовары

Субстрат	Биовары			
	1	2	3	4
Рамноза	-	+	+	-
Салицин	+	+	-	-

Приложение 20
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Дифференциация *Providencia alcalifaciens* и *Providencia stuartii* на биовары

Субстрат	<i>Providencia alcalifaciens</i>				<i>Providencia stuartii</i>	
	биовары				биовары	
	1	2	3	4	5	6
Глюкоза (газ)	+	-	+	-	-	-
Адонит	+	+	-	-	-	+
Инозит	-	-	-	-	+	+

Приложение 21
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Основные дифференциальные признаки *Vibrio parahaemolyticus*
и других галлофилов

Наименование тестов	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio angillarum</i>
Подвижность	+	+	+
рост в пептонном бульоне без NaCl	-	-	-
с 6% NaCl	+	+	+
с 8% NaCl	+	+	-
с 10% NaCl	-	+	-
Образование ацетилкарбинола	-	+	+
Ферментация:			
сахарозы	-(+)	+(-)	+(-)
арабинозы	+(+)	-(+)	+

Примечание: - отрицательная реакция; + положительная реакция; -, (+) чаще отрицательная реакция; (+), - чаще положительная реакция

Приложение 22
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Схема посева материала при исследовании на *V.cereus*

Объект исследования		Разведение посевного материала			
		1x10	1x100	1x1000	1x10000
Кал	посевная доза в мл*	1,0	0,1	-	-
Рвотные массы		1,0	0,1	-	-
Промывные воды желудка		1,0	0,1	-	-

Примечание: *При посеве 1,0 мл материал засеивается по 0,3 мл на поверхность трех чашек Петри.

Приложение 23
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Тесты для идентификации *Staphylococcus aureus*

№ варианта	Наличие				Ферментация маннита в анаэробных условиях	Принадлежность штамма к виду <i>Staphylococcus aureus</i>
	пигмента	лецитиназы	коагулазы	ДНК-азы		
1.	+	+	+			да
2.	-	+	+			да
3.	+	-	+			да
4.	-	-	+			?
4а.	-	-	+	+		да
4б.	-	-	+	-		нет
4в.	-	-	+		+	да
4г.	-	-	+		-	нет
5.	-	-	-			нет
6.	-	+	-			нет
7.	+	-	-			нет
8.	+	+	-			?
8а.	+	+	-	+		да
8б.	+	+	-	-		нет
8в.	+	+	-		+	да
8г.	+	+	-		-	нет

Приложение 24

к Инструкции 4.2.10-15-21-2006

«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Дифференциация энтерококков внутри вида

Виды	Резистентность к теллуриду калия	Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда			Подвижность в 0,2% агаре
		редукция ТТХ	гемолиз	протеолиз	
<i>S. faecalis</i>	+	+	±	±	-
<i>S. faecium</i>	-	-	±	-	-
Подвижные энтерококки	+	+	±	-	+

Примечание: - отрицательный результат; + положительный результат; ± данный признак у одних штаммов положителен у других отрицателен.

Приложение 25

к Инструкции 4.2.10-15-21-2006

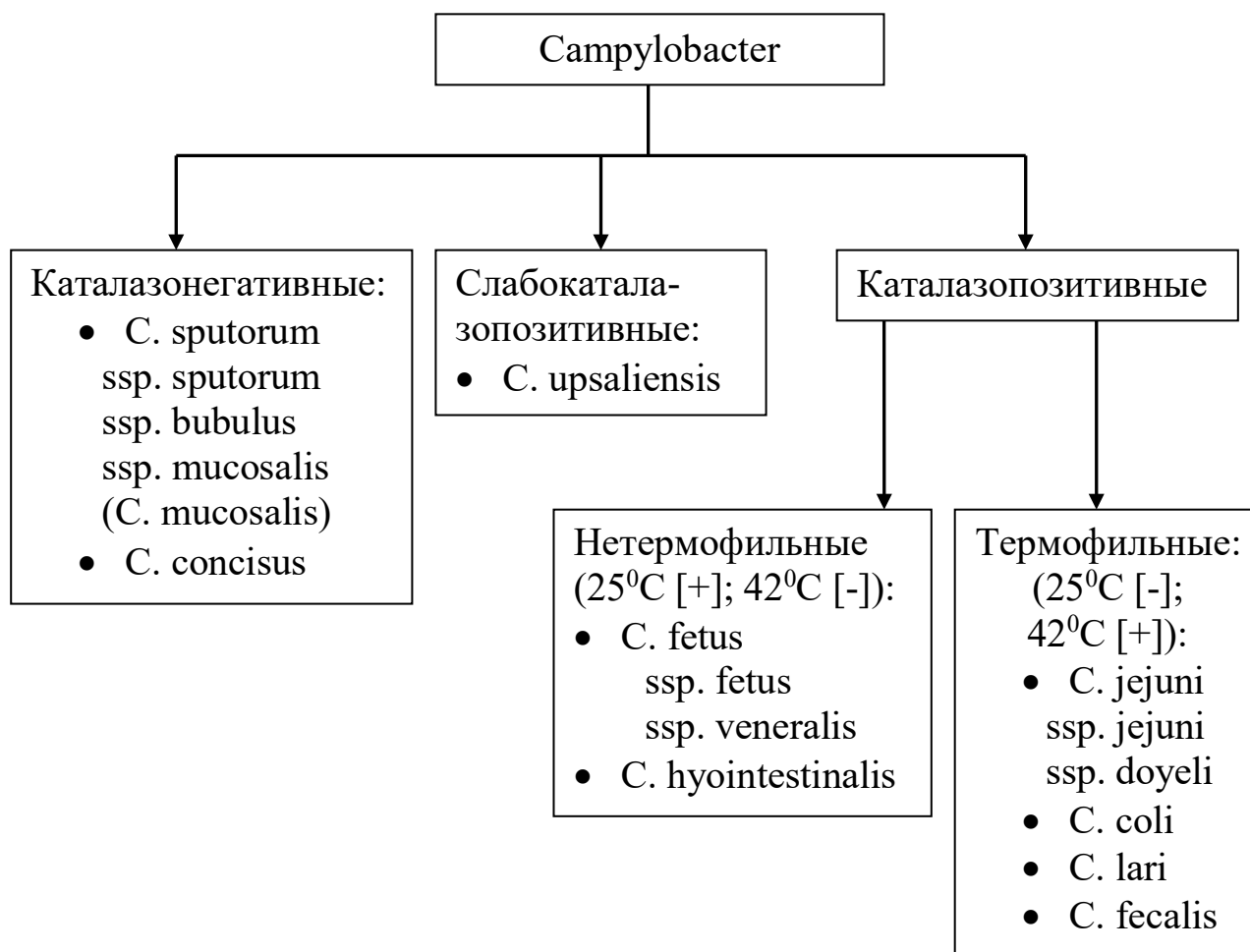
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Типовой протокол постановки развернутой реакции нейтрализации

	Исследуемый материал в мл	Антиботулинические сыворотки в мл					Физиологический раствор
		тип А	тип В	тип С	тип Е	тип F	
1 пробирка	2,4	0,6	-	-	-	-	-
2 пробирка	2,4	-	0,6	-	-	-	-
3 пробирка	2,4	-	-	0,6	-	-	-
4 пробирка	2,4	-	-	-	0,6	-	-
5 пробирка	2,4	-	-	-	-	0,6	-
6 пробирка	2,4	-	-	-	-	-	0,6 мл

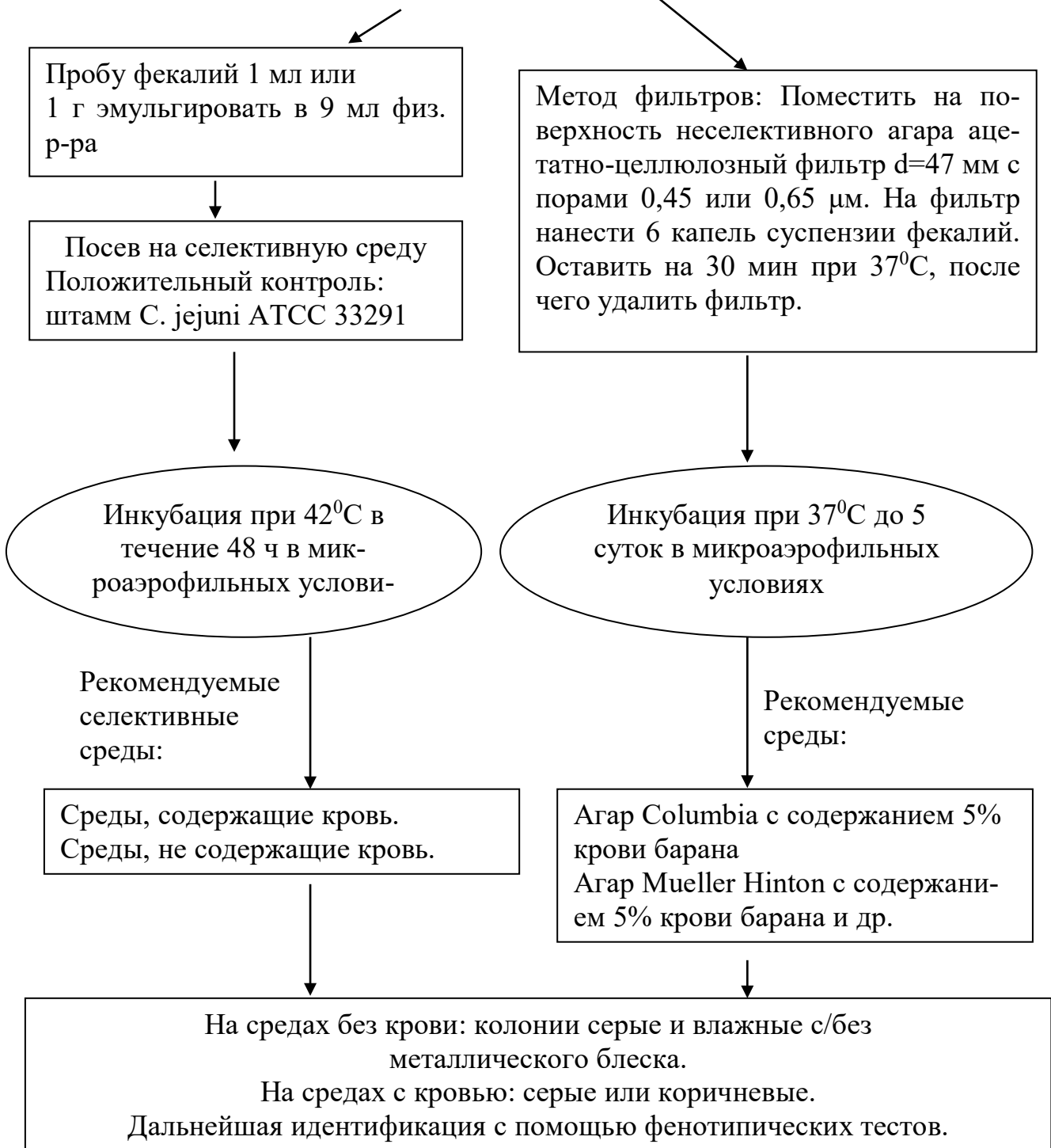
Приложение 26
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Упрощенная классификация кампилобактеров



Приложение 27
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Протокол выделения *Campylobacter* из фекалий



Приложение 28
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделе-
ния и идентификации возбудителей при
бактериальных пищевых отравлениях»

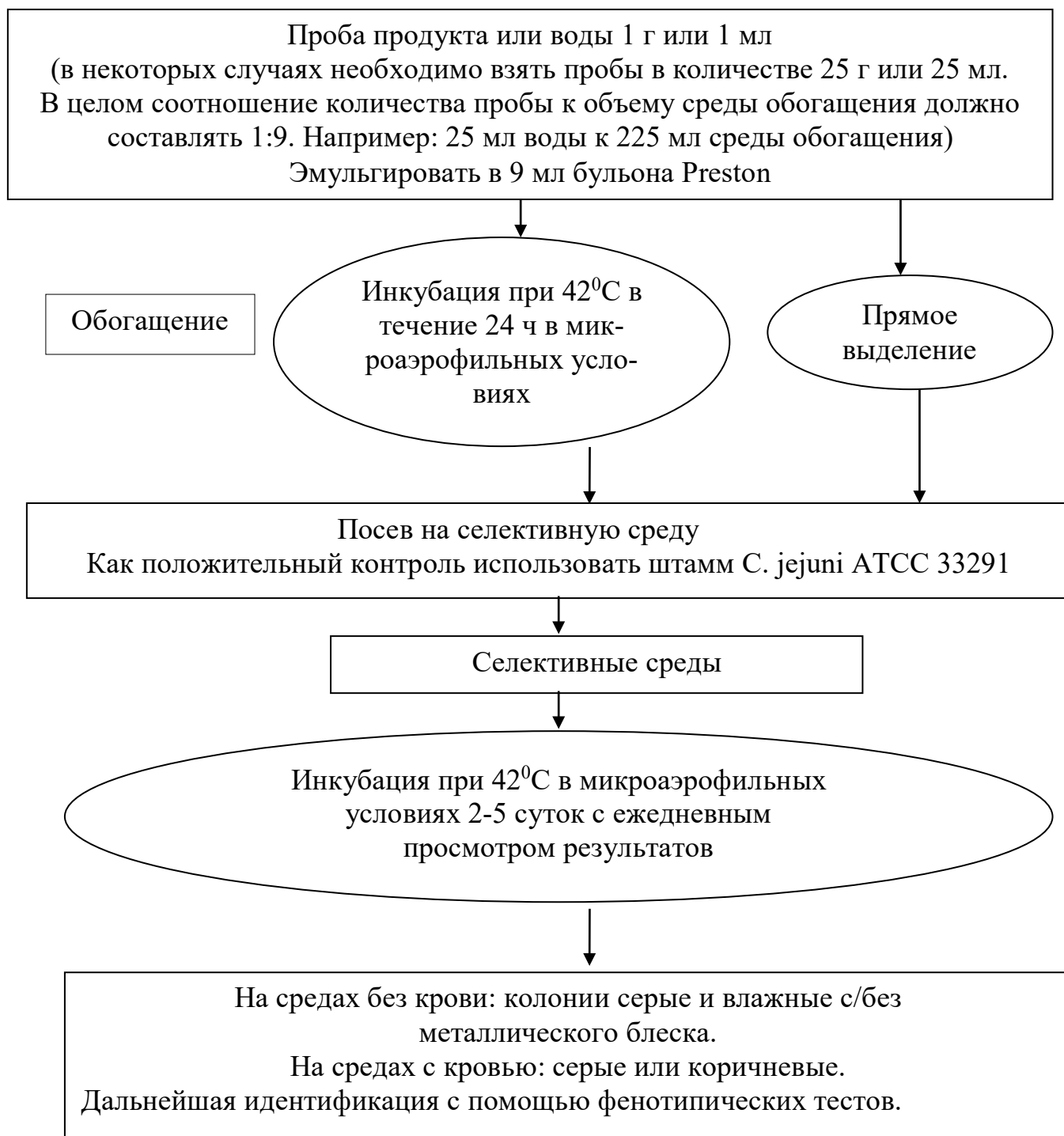
Биохимическая характеристика основных видов *Campylobacter*,
выделенных из проб фекалий, воды и пищевых продуктов

	<i>C. jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C.upsaliensis</i>
тест КОН	+	+	+	+
тест с каталазой	+	+	+	W+
тест с оксидазой	+	+	+	+
гидролиз гиппурата	+	-	-	-
гидролиз индоксилацетата	+	+	-	+

Примечание: «W+» - слабоположительная, учет результата проводят под микроскопом.

Приложение 29
к Инструкции 4.2.10-15-21-2006
«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях»

Протокол выделения *Campylobacter* из продуктов и воды



ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция разработана ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (Гринь В.В., Себут Н.С., Гулин В.В., Пашкович В.В., Фидаров Ф.М., Марейко А.М., Федоренчик Л.А., Бискина Н.М., Клавсуть Г.А.), ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (Коломиец Н.Д., Тонко О.В.).

2. Утверждена постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь 9 октября 2006г., № 120.

3. Введена взамен «Инструкции о порядке расследования учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях» № 1135-73, утвержденной Главным государственным санитарным врачом СССР 20 декабря 1973г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция 4.2.10-15-21-2006

«Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при
бактериальных пищевых отравлениях»

	стр.
Глава 1 Область применения.....	2
Глава 2 Отбор, направление и подготовка проб для бактериологических исследований.....	2
Глава 3 Бактерии рода <i>Salmonella</i>	8
Глава 4 Бактерии рода <i>Shigella</i>	16
Глава 5 Бактерии рода <i>Escherichia</i>	19
Глава 6 Бактерии рода <i>Proteus</i>	23
Глава 7 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
Глава 8 <i>Bacillus cereus</i>	28
Глава 9 <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Глава 10 <i>Enterococcus</i>	35
Глава 11 <i>Clostridium botulinum</i>	37
Глава 12 <i>Clostridium perfringens</i>	46
Глава 13 <i>Campylobacter</i>	51
Глава 14 Серологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями.....	55
Глава 15 Исследование объектов внешней среды (вода, смывы)	55
Глава 16 Ускоренные методы диагностики	57
Глава 17 Питательные среды и реактивы	59
Приложение 1 Дифференциальные характеристики видов и подвидов сальмонелл	72
Приложение 2 Биохимические свойства бактерий рода <i>Salmonella</i>	73
Приложение 3 Сокращенная схема Кауфмана-Уайта 2001.....	74
Приложение 4 Дифференциация родов семейства <i>Enterobacteriaceae</i> по биохимическим свойствам.....	77
Приложение 5 Основные дифференциальные признаки сальмонелл и сходных энтеробактерий.....	79
Приложение 6 Биохимические свойства сальмонелл.....	80
Приложение 7 Классификация бактерий рода <i>Shigella</i>	80
Приложение 8 Биохимические свойства бактерий рода <i>Shigella</i>	81
Приложение 9 Биохимические свойства шигелл различных видов.....	82
Приложение 10 Схема определения биоваров <i>S. sonnei</i>	83
Приложение 11 Биовары <i>S. flexneri</i> 6 (<i>S. newcastle</i>)	83
Приложение 12 Биовары <i>S. flexneri</i> 1-5, X-и Y-variant	84
Приложение 13 Биовары <i>S. boydii</i>	84
Приложение 14 Основные биохимические свойства <i>E. coli</i>	85
Приложение 15 Серовары <i>Escherichia coli</i> , наиболее часто вызывающие поражения у человека.....	86

Приложение 16 Антигенно-диагностическая схема сероваров <i>E. coli</i> , наиболее часто вызывающих кишечные инфекции.....	87
Приложение 17 Биохимическая дифференциация <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> и <i>Morganella morganii</i>	88
Приложение 18 Сокращенная антигенно-диагностическая схема <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	89
Приложение 19 Дифференциация <i>Providencia rettgeri</i> на биовары	90
Приложение 20 Дифференциация <i>Providencia alcalifaciens</i> и <i>Providencia stuartii</i> на биовары	90
Приложение 21 Основные дифференциальные признаки <i>Vibrio parahaemolyticus</i> и других галлофилов	90
Приложение 22 Схема посева материала при исследовании на <i>B.cereus</i> ...	91
Приложение 23 Тесты для идентификации <i>Staphylococcus aureus</i>	91
Приложение 24 Дифференциация энтерококков внутри вида	92
Приложение 25 Типовой протокол постановки развернутой реакции нейтрализации	92
Приложение 26 Упрощенная классификация кампилобактеров	93
Приложение 27 Протокол выделения <i>Campylobacter</i> из фекалий	94
Приложение 28 Биохимическая характеристика основных видов <i>Campylobacter</i> , выделенных из проб фекалий, воды и пищевых продуктов	95
Приложение 29 Протокол выделения <i>Campylobacter</i> из продуктов и воды	96