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

4.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологический анализ парфюмерно-косметической продукции экспресс-методом биолюминесценции

Методические рекомендации
МР 4.2.0015—10

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.204.1
М59

М59 **Микробиологический** анализ парфюмерно-косметической продукции экспресс-методом биолюминесценции: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—23 с.

1. Разработаны: ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге» (Т. А. Гречанинова, Н. С. Григорьева, Е. М. Иванова, В. А. Свирщевская, В. В. Иванова); Научно-исследовательским институтом медицины труда РАМН (Н. И. Измерова, Н. К. Просветова).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 1.12.2010.

3. Введены в действие с момента утверждения.

4. Введены впервые.

ББК 51.204.1

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

I. Область применения 4
II. Общие положения 4
III. Метод отбора и подготовки проб для микробиологического анализа 5
IV. Метод анализа 8
V. Аппаратура, реагенты, питательные среды, расходные материалы 10
Приложение. Метод определения пригодности пробы готового продукта для микробиологического анализа с использованием биолюминисценции АТФ (Sample Effect Method) 14
Библиографические данные 23

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
1 декабря 2010 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Микробиологический анализ парфюмерно-косметической продукции экспресс-методом биолюминесценции

Методические рекомендации МР 4.2.0015—10

I. Область применения

1.1. Методические рекомендации могут использоваться при проведении исследований микробиологической загрязненности парфюмерно-косметической продукции с помощью альтернативного автоматизированного экспресс-метода биолюминисценции.

1.2. Методические рекомендации предназначены для специалистов аккредитованных бактериологических лабораторий и могут быть использованы в органах и организациях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, промышленных, испытательных лабораториях, а также иных организациях, занимающихся вопросами оценки безопасности парфюмерно-косметической продукции.

1.3. Методические рекомендации адаптированы к условиям работы лабораторий, осуществляющих контроль качества и безопасности парфюмерно-косметической продукции.

II. Общие положения

2.1. Классические методы микробиологических исследований парфюмерно-косметической продукции, используемые в практике бактериологических лабораторий, требуют больших затрат труда и времени,

достаточно длительны и позволяют получать результаты в течение нескольких дней.

Предлагаемый ускоренный метод с использованием люминометра заключается в определении АТФ, синтезируемой микроорганизмами и определяемой по интенсивности возникающего свечения в ходе ферментативной реакции, позволяет получать быстрые (в течение нескольких часов) и надежные результаты для большого числа одновременно исследуемых образцов.

2.2. Биолюминесцентный метод определения АТФ является качественным методом определения микробиологической загрязненности парфюмерно-косметической продукции и может быть также использован для исследования некоторых видов сырья.

В настоящих методических рекомендациях представлено описание процедуры микробиологического анализа парфюмерно-косметической продукции экспресс-методом биолюминесценции с использованием люминометра Advance Coupe (Celsis International, Нидерланды).

2.3. Работы по подготовке реагентов, образцов продукции, проведению исследования на приборе, а также интерпретации результатов должны выполняться квалифицированными сотрудниками.

2.4. Технология использования метода.

Подготовленные образцы продукции в стерильном нейтрализующем летиновом бульоне (Letheen broth) инкубируются в течение 18 или 24 часов (в зависимости от типа продукта) и исследуются на приборе Люминометр Advance Coupe с использованием стандартной АТФ и набора реагентов UNI-1 + kit. По окончании анализа компьютерная программа выдает краткое описание полученных результатов, выраженных в относительных единицах света (RLU- RELATIVE LIGHT UNITS).

III. Метод отбора и подготовки проб для микробиологического анализа

3.1. Отбор проб

3.1.1. При отборе проб следует руководствоваться требованиями ГОСТ 29188.0—91 «Парфюмерно-косметические изделия. Правила приемки, отбор проб, методы органолептических испытаний» и ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических анализов».

3.1.2. Пробы парфюмерно-косметических изделий для микробиологического анализа отбирают до отбора проб для физико-химических, органолептических и других видов испытаний с соблюдением правил асептики, для того чтобы исключить вторичное микробное загрязнение продукта.

3.2. Подготовка проб к анализу

3.2.1. Подготовка проб для определения микробиологической чистоты

3.2.1.1. Перед вскрытием упаковки образец тщательно перемешивают, вращая или переворачивая его несколько раз. Место соединения крышки с тарой обрабатывают 70 %-ым раствором этилового спирта. Первую порцию (примерно 10 %) содержимого упаковки отбрасывают, затем перемешивают стерильной петлей и отбирают пробу.

3.2.1.2. Используя стерильные приемы, отвешивают требуемое количество продукта в стерильный пластиковый контейнер и добавляют стерильный нейтрализующий летиновый бульон (п. 5.1.1), чтобы инактивировать действие консерванта в продукте.

Летиновый бульон рекомендуется как стандартная, обеспечивающая соответствующий начальный уровень АТФ, нейтрализующая среда для широкого спектра консервантов и определения различных видов заражения.

Количество продукта, необходимое для приготовления пробы, определяется заранее по методике «Метод определения пригодности пробы» (Sample Effect Method) согласно прилож. 1 к настоящим методическим рекомендациям.

Соотношение продукта и питательного летинового бульона должно сохраняться равным 1 : 99.

В качестве наилучшей практики рекомендуется 1 г продукта поместить в 99 мл бульона. Однако не все лаборатории располагают необходимыми возможностями и площадью для таких размеров испытуемого образца. В таких случаях допускается уменьшать количество продукта до 0,1 г и помещать его в 9,9 мл бульона, сохраняя неизменным соотношение 1 : 99.

3.2.1.3. В асептических условиях (желательно в ламинарном боксе) добавить в пластиковый контейнер с отвешенным продуктом летиновый бульон и тщательно закрыть крышку контейнера. Перемешать на вихревом миксере, убедившись, что продукт полностью диспергирован в бульоне. Таким образом, получается разведение 10^{-2} или 1 : 100.

3.2.1.4. Слегка ослабить крышку контейнера (на пол-оборота) и поместить его в шейкер-инкубатор на 24 часа при температуре (30 ± 3) °С. Рекомендуемая скорость вращения образцов в шейкер-инкубаторе 150—200 об./мин для полной уверенности, что продукт в течение всего времени остается полностью диспергированным в бульоне, не оседает на дно контейнера и не переливается через его край.

3.2.1.5. Определение собственной антимикробной активности парфюмерно-косметической продукции проводят в соответствии с МУК 4.2.801—99 «Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции».

3.2.2. Подготовка отрицательного и положительного контроля

3.2.2.1. Отрицательный контроль используется в каждом тесте для определения уровня RLU, по сравнению с которым будут оцениваться пробы продукта. Летиновый бульон содержит небольшое количество АТФ и обеспечивает соответствующий начальный уровень АТФ.

В асептических условиях поместить в пластиковый стерильный контейнер 99 мл (либо 9,9 мл) летинового бульона. Для контроля следует использовать летиновый бульон той же партии, что и в подготовке тестируемых проб. В случае если при подготовке проб продукта использован бульон нескольких партий, следует подготовить контрольные образцы бульона из каждой партии. Инкубировать вместе с подготовленными пробами продукта в шейкер-инкубаторе.

3.2.2.2. Положительный контроль.

В асептических условиях поместить в пластиковый стерильный контейнер 99 мл (либо 9,9 мл) летинового бульона. С помощью стерильной пластиковой петли переместить криобусину, нагруженную свежей культурой (18—24 часов) Staphylococcus epidermidis, в летиновый бульон (п. 5.6). Для продуктов с pH < 5 используется криобусина, нагруженная свежей культурой Saccharomyces cerevisiae (п. 5.6).

Перемешать на вихревом миксере, убедившись, что культура полностью диспергирована в бульоне. Инкубировать вместе с подготовленными пробами продукта в шейкер-инкубаторе.

3.2.3. Дополнительное разведение образцов

3.2.3.1. После 24-часового инкубирования проб продукции вынуть образцы из шейкер-инкубатора и перемешать на вихревом миксере в течение 10—15 секунд каждый.

Подготовить следующее десятикратное разведение каждого образца в стерильной дистиллированной воде. Для этого 1 мл образца поместить в заранее подготовленный стерильный пластиковый контейнер, содержащий 9 мл стерильной дистиллированной воды, и тщательно перемешать на вихревом миксере. Полученное разведение – 10^{-3} или (1 : 1 000).

Если на стадии определения количества продукта «Методом определения пригодности пробы» выявлено, что для данного продукта

наиболее эффективно использовать разведение 10^{-2} (1 : 100), то дополнительное разведение не требуется.

3.2.3.2. Если установлено, что пробы продукта тестируются в разведении 1 : 1 000, то и используемые для отрицательного контроля образцы стерильного летинового бульона, а также образец положительного контроля культуры Staphylococcus epidermidis после инкубирования должны быть разведены 1 : 10 в стерильной дистиллированной воде по п. 3.2.3.1.

3.2.3.3. Полученные разведения используют для тестирования на приборе. Время с момента окончания подготовки пробы до начала тестирования не должно превышать 30 мин.

IV. Метод анализа

$$\text{АТФ} + O_2 + \text{ЛЮЦИФЕРИН} \Rightarrow \text{АМФ} + CO_2 + \text{ОКСИЛЮЦИФЕРИН} + \text{ПИРОФОСФАТ} + \text{СВЕТ}$$

При работе люминометра в процессе инжекции реагентов, АТФ – высвобождающий реагент (Lumex EX), поступающий в каждый образец продукта, способствует экстракции АТФ из клеток микроорганизмов, находящихся в пробе продукта. Количество присутствующей в пробе АТФ измеряется по количеству света в ходе каталитической реакции с комплексом люциферин/люцифераза (LUMEN ATE), оценивается в относительных единицах света (RLU) и используется для заключения о присутствии или отсутствии микробиологического заражения продукта.

4.1. Подготовка кювет для люминометра

4.1.1. По 100 μл (0,001 мл) исследуемого материала из разведений, приготовленных по п. 3.2.3.1 поместить на дно индивидуальной кюветы для люминометра. Убедиться в отсутствии материала на стенках кюветы.

4.1.2. Подготовить все пробы продуктов, а также контрольные образцы (два отрицательных и один положительный) по п. 4.1.1.

4.1.3. Поместить в индивидуальную кювету 100 μл (0,001 мл) стандартного АТФ (ATP standard), поставляемого в наборе реагентов UNI 1 + kit (п. 5.2.1).

4.2. Проведение анализа на люминометре

После начальной заправки реактивами следует провести измерения для получения серии «ежедневных контролей» (т. е. значений для пустых кювет, чистого реактива и АТФ-контроля), чтобы убедиться в нормальной работе люминометра и реактивов. После того как эти проверки будут проведены, и оператор убедится, что все системы работают нормально, можно проводить анализ проб.

4.2.1. Загрузить кюветы в люминометр в порядке, указанном в Руководстве по работе с прибором.

4.2.2. Работа люминометра и инжекция реагентов Lumex EX и LUMEN ATE (п. 5.2.1) в присутствии которых протекает каталитическая реакция биолюминесценции, происходит в автоматическом режиме, управляемом компьютерной программой.

4.2.3. Количество света на выходе каждого образца измеряется и оценивается по отношению к контрольным стерильным бульонам.

Образцы, показания которых RLU не превышают среднее показание контрольных стерильных нейтрализующих бульонов более чем в 1,4 раза, считаются соответствующими стандарту микробиологического качества (PASS). Все неудачные образцы отмечаются в списке с положительным результатом (Positive) и должны быть исследованы повторно.

4.3. Обработка результатов

4.3.1. Отрицательные результаты.

Образец, который по результатам проведенного теста на люминометре оценивается как PASS, указывает, что продукт отвечает микробиологической чистоте (< 300 КОЕ/г) и может быть выпущен на реализацию.

4.3.2. Положительные результаты.

Образец, который по результатам проведенного теста на люминометре оценивается как (Positive), указывает, что продукт может быть заражен микроорганизмами и, необходимо провести дополнительное повторное испытание этого продукта на люминометре и классическим методом в соответствии МУК 4.2.801—99 «Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции».

4.3.3.Оценка положительных результатов.

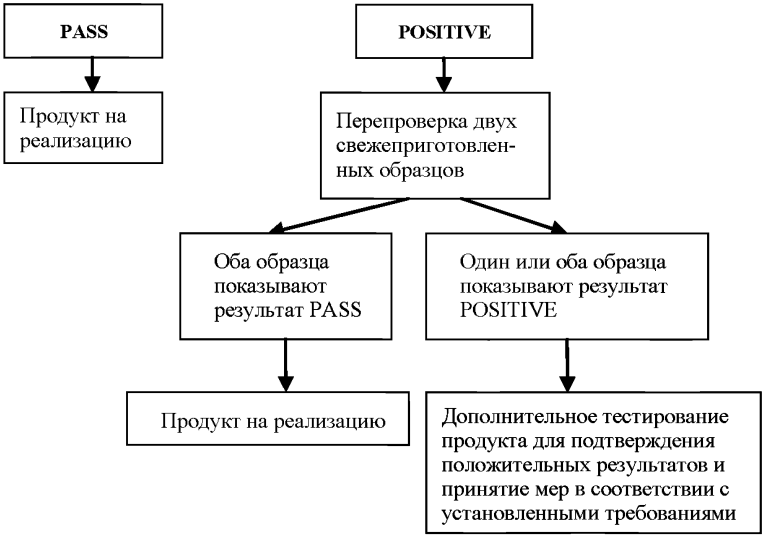
Положительные результаты теста указывают, что продукт может быть заражен, так как результат RLU образца превышает в 1,4 раза результат стерильного летинового бульона. В этом случае следует немедленно перепроверить этот продукт двойным количеством образцов.

Если по результатам «Метода определения пригодности пробы» продукт тестируется в разведении 10^{-3}, то должны быть приготовлены свежие разведения в стерильной дистиллированной воде из образца продукта, инкубированного в течение 24-х часов.

В случае если результаты RLU двух свежеприготовленных образцов отрицательные, не превышают в 1,4 раза результат стерильного летинового бульона и выражаются как PASS, то продукт может выпущен на реализацию.

В случае если один или оба свежеприготовленных образца показывают положительный результат, т. е. превышают в 1,4 раза результат стерильного летинового бульона и выражаются как (Positive), должны быть срочно приняты меры в соответсвии с установленными в организации требованиями в области качества.

4.4. Диаграмма испытания образцов при получении положительных результатов



V. Аппаратура, реагенты, питательные среды, расходные материалы

5.1. Питательные среды

5.1.1. Летиновый бульон (Letheen Broth), используется для продуктов с любым pH. Состав летинового бульона: белковый пептон – 10,0 г; мясопептонный агар – 5,0 г; лецитин – 0,7 г; полисорбат 80 (Твин-80) – 5,0 г; натрия хлорид – 5,0 г, pH – 7,0 ± 0,2.

5.1.2. Жидкая среда Сабуро (Sabouraud Liquid Medium) для продуктов с низким pH (< 5).

5.1.3. Триптонсоя бульон (TryptoneSoya Broth).

5.2. Реагенты

5.2.1. Набор реагентов UNI-1 + kit на 1 000 тестов.

Хранение при температуре 0—4 °С.

Каждый набор включает: 6 фл. × 18,8 биолюминесцентного реагента (Lumine EX)

6 фл. × АТФ высвобождающего реагента (Lumine ATE)

6 фл. × 12 мл восстанавливающего буфера (Lumen ATE buffer)

1 фл. × АТФ стандарт (ATP standards)

1 фл. × 15 мл АТФ буфер (ATP buffers)

5.2.2. Набор реагентов Daily Wash & Rinse kit для ежедневной промывки и ополаскивания люминометра.

Каждый набор включает: 14 фл. × Раствор для промывки инжекторов

14 фл. × Раствор для ополаскивания инжекторов

5.2.3. Набор реагентов Monthly Maintenance & Cleaning kit для ежемесячного ухода и очистки люминометра.

Каждый набор включает:

6 фл. × 12 мл реагент 1 (Reagent 1) – водный раствор для очистки инжекторов

6 фл. × 22 мл реагент 2 (Reagent 2) – водный раствор для дезинфекции инжекторов

6 фл. × 22 мл реагент 3 (Reagent 3) – водный раствор для промывки инжекторов.

5.3. Приборы

5.3.1. Люминометр.

5.3.2. Комьпютер с операционной системой Windows XP.

5.3.2. Весы электронные по 1 классу точности, дискретность отсчета 0,001 г.

5.3.3. Шейкер инкубатор 28 °С, 150—200 об./мин.

5.3.4. Автоклав.

5.3.5. Вихревой миксер.

5.3.6. Автоматический дозатор 100 мкл (0,1 мл).

5.3.7. Криоблок PL 155, металлический штатив для хранения криовиал, нагруженных культурой микроорганизмов в замороженном состоянии.

5.4. Расходные материалы

5.4.1. Контейнеры пластиковые стерильные одноразовые с завинчивающейся крышкой 30 или 150 мл.

5.4.2. Пипетки пластиковые стерильные одноразовые в индивидуальной упаковке 1 и 10 мл.

5.4.3. Петли пластиковые стерильные одноразовые 1 мкл.
5.4.4. Наконечники для дозатора Fintip стерильные, упаковка: 10 штативов по 96 штук.
5.4.5. Кюветы для люминометра пластиковые Advance Cuvettes.
5.4.6. Microbank PL 160

- набор криовиал с цветными бусинами для хранения культуры Staphyloccocus epidermidis и Saccharomyces cerevisiae.

5.4.7. Петли CULTI-LOOPS, нагруженные лиофилизированной культурой St.epidermidis и Saccharomyces cerevisiae.

5.5. Приготовление стерильного нейтрализующего бульона и стерильной дистиллированной воды

5.5.1. Приготовление стерильного нейтрализующего бульона

5.5.1.1. Отвесить дегидратированную сухую среду как указано в инструкции производителя.

5.5.1.2. Тщательно перемешать с требуемым количеством дистиллированной воды.

5.5.1.3. Нагревать до полного растворения порошка в воде.

5.5.1.4. Как только порошок полностью растворится, снять с плитки и остудить. Разлить в стерильные колбы с завинчивающейся крышкой.

5.5.1.5. Маркировать колбы, указав название бульона, дату приготовления и срок годности.

5.5.1.6. Автоклавировать в течение 15 минут при температуре 121 °С. При каждом цикле стерилизации проводить контроль температуры и времени с помощью индикаторов стерилизации (полосок или химических).

5.5.1.7. Стерильный бульон может храниться при комнатной температуре в сухом месте в течение 3-х месяцев. По истечении этого срока остатки бульона следует утилизировать.

5.5.2. Подготовка стерильной дистиллированной воды

5.5.2.1. Стерильные колбы с дистиллированной водой (250 мл) маркировать, указав дату стерилизации и поместить в автоклав для стерилизации в течение15 минут при температуре 121 °С. При каждом цикле стерилизации проводить контроль температуры и времени с помощью индикаторов стерилизации (полосок или химических).

5.5.2.2. Стерильная дистиллированная вода может храниться при комнатной температуре в сухом месте в течение 3-х месяцев. По истечении этого срока остатки воды следует утилизировать.

5.6. Подготовка криобусины для положительного контроля

5.6.1. Для подготовки свежей культуры (18—24 ч) Staphylococcus epidermidis или Saccharomyces cerevisiae используются петли CULTI-LOOPS (п. 5.4.7), нагруженные стабилизированными жизнеспособными микроорганизмами.

К работе с использованием петель должен допускаться обученный в соответствии с инструкцией поставщика персонал.

Удалив упаковку и наконечник с петли, поместить ее в пробирку с жидкой средой, используя для этой цели:

а) Триптонсоя бульон (TryptoneSoya Broth) (п. 5.1.3) для петель, нагруженных культурой Staphylococcus epidermidis;

б) Стерильный солевой раствор для петель, нагруженных культурой Saccharomyces cerevisiae.

Культуры Staphylococcus epidermidis и Saccharomyces cerevisiae выращивают в жидкой среде в условиях инкубирования при температуре 37 °С до полного растворения пленки, покрывающей петлю и образования взвеси микроорганизмов.

Используя стерильную пастеровскую петлю, пересевают культуру по поверхности хорошо подсушенной среды штрихами для получения изолированных колоний.

Инкубируют чашки с посевами при 30 °С в течение 24—48 часов.

5.6.2. Для хранения чистой культуры Staphylococcus epidermidis или Saccharomyces cerevisiae используются криовиалы, содержащие 25 цветных бусин и криоконсервант (п. 5.4.6). Бусины имеют пористую структуру, что позволяет микроорганизмам задерживаться на их поверхности.

5.6.3. В стерильных условиях изолированные колонии микроорганизмов с чашки Петри (п. 5.6.1) пересевают в криовиалу с криоконсервантом до достижения 3—4 McFarland стандарта.

Тщательно завинчивают крышку криовиалы и вращают ее 4—5 раз для распределения культуры микроорганизмов. Избыточное количество криоконсерванта удаляют из криовиалы.

Плотно закрытую криовиалу с культурой устанавливают в криоблок (п. 5.3.7) и хранят при температуре на выше –32 °С в морозильной камере.

5.6.4. Перед подготовкой положительного контроля (п. 3.2.2.2), криовиалу с культурой микроорганизмов выдерживают несколько минут при комнатной температуре, оставляя криоблок в морозильной камере. После перемещения одной бусины из криовиалы в контейнер с летиновым бульоном, криовиалу устанавливают в криоблок и хранят для последующих тестов.

Приложение 1

Метод определения пригодности пробы готового продукта для микробиологического анализа с использованием биолюминисценции АТФ (Sample Effect Method)

Эта методика может использоваться для подтверждения пригодности готовых продуктов для микробиологического анализа с использованием систем биолюминисценции АТФ и для определения степени разведения, при которой следует проводить анализ проб. Методика также может применяться для определения пригодности сырья для проведения микробиологического анализа с использованием систем биолюминисценции АТФ.

Не все виды сырья и готовых продуктов пригодны для тестирования с использованием биолюминисценции АТФ; в некоторых может содержаться повышенное количество природного АТФ (т. е. в продуктах, содержащих натуральные экстракты, например, алоэ вера), что может привести к получению «ложно-положительных» результатов. Другие материалы, такие как сложные полимеры, могут ингибировать реакцию биолюминисценции в системе АТФ, что может привести к получению «ложно-отрицательных» результатов. Поэтому важно знать, является ли сырье или продукт пригодным для тестирования с помощью микробиологического анализа с использованием систем биолюминисценции АТФ, а также знать необходимую степень разведения.

1. ПРИНЦИП

Выбранная проба приготавливается в соответствующей нейтрализующей среде при разведении 1 : 10; затем приготавливаются два следующих разведения (1 : 100 и 1 : 1 000). Двойные аликвоты (100 мкл) всех разведений помещают в кюветы люминометра + 10 мкл стандарта АТФ. Затем проводят измерения всех проб и соответствующих контролей на люминометре с использованием стандартного набора Uni1+; полученные результаты сравнивают с контролями, используя таблицу Microsoft excel, которая автоматически определяет возможность проведения тестирования АТФ для каждого разведения индивидуальных проб.

2. РЕАКЦИИ

$$\text{АТФ} + O_2 + \text{ЛЮЦИФЕРИН} \Rightarrow \text{АМФ} + CO_2 + \text{ОКСИЛЮЦИФЕРИН} + \text{ПИРОФОСФАТ} + \text{СВЕТ}$$

Высвобождающий АТФ агент (LuminEX) вводится в каждую пробу и облегчает экстракцию АТФ из клеток. Количество имеющегося АТФ затем измеряется с использованием каталитической реакции, запускае-

мой комплексом люциферин/люцифераза (LuminATE). Сила света, излучаемого в каждой пробе, выражается в относительных единицах силы света (RLU) и используется для определения наличия/отсутствия бактериального загрязнения пробы.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБ

3.1. Перед взятием проб тщательно перемешайте тестируемый материал (готовый продукт или сырье), а перед взятием проб зубной пасты первую порцию продукта, выдавленную из тюбика, выбросьте.

3.1.1. Соблюдая стерильность, взвесьте 1,0 г (± 0,05 г) пробы и поместите в стерильный контейнер.

3.1.2. Соблюдая стерильность, добавьте к пробе 9 мл нейтрализующего бульона и тщательно перемешайте; это будет разведение 1 : 10 или –1. Приготовьте последовательные разведения следующим образом: соблюдая стерильность, перенесите 1 мл разведения –1 в 9 мл нейтрализующего бульона, это будет разведение 1 : 100 или –2, тщательно перемешайте и, соблюдая стерильность, перенесите 1 мл разведения –2 в 9 мл нейтрализующего бульона, это будет разведение 1 : 1000 или –3.

3.1.3. Укажите на каждом контейнере необходимые сведения о пробе.

3.2. Подготовка люминометра к работе

3.2.1. Люминометр следует подготовить к работе в соответствии со специальными инструкциями производителя. Каждый инжектор люминометра, который предполагается использовать при тестировании, следует вымыть и ополоснуть с помощью набора для ежедневного мытья и ополаскивания компании-производителя люминометра перед заправкой реактивами из набора Uni 1+.

3.2.2. После начальной заправки реактивами следует провести измерения для получения серии «ежедневных контролей» (т. е. значений для пустых кювет, чистого реактива и АТФ-контроля), чтобы убедиться в нормальной работе люминометра и реактивов. После того как эти проверки будут проведены, и оператор убедится, что все системы работают нормально, можно проводить анализ проб.

3.2.3. Для каждой тестируемой пробы необходимо в сумме 12 кювет, как указано ниже

2 × 100 мкл 1 : 10 (–1) разведение пробы в бульоне
2 × 100 мкл 1 : 10 (–1) разведение пробы в бульоне + 10 мкл АТФ
2 × 100 мкл 1 : 100 (–2) разведение пробы в бульоне
2 × 100 мкл 1 : 100 (–2) разведение пробы в бульоне + 10 мкл АТФ
2 × 100 мкл 1 : 1000 (–3) разведение пробы в бульоне
2 × 100 мкл 1 : 1000 (–3) разведение пробы в бульоне + 10 мкл АТФ

Кроме того, для каждого измерения необходимо:
2 × 100 мкл контроля для бульона
2 × 100 мкл контроля для бульона + 10 мкл АТФ
1 × 50 мкл стандарта АТФ
1 положительный контроль

NB: Для каждой пробы СЛЕДУЕТ использовать чистые и стерильные наконечники пипеток. Рекомендуется располагать кюветы в соответствующем держателе в логическом порядке (рис. 1).

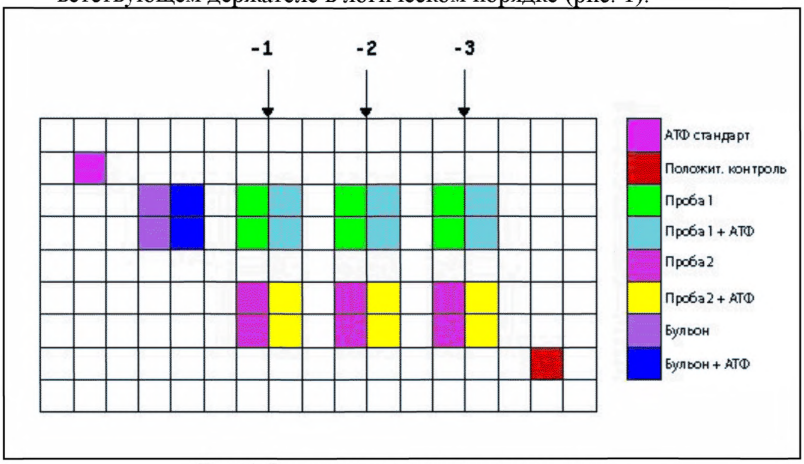


Рис. 1. Расположение кювет в держателе

4. РАСЧЕТЫ И ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Вычисление результатов

При каждом анализе, проводимом с помощью люминометра, следует записывать следующие значения (в относительных единицах силы света – RLU):

- Среднее значение для контрольного бульона;
- Два результата для контрольного бульона + АТФ;
- Два значения для каждой пробы в бульоне;
- Два значения для каждой пробы в бульоне +АТФ.

Например, при условии, что пробы 1 и 2 тестировались в люминометре одновременно, средние значения для контрольного бульона и значения для контрольного бульона + АТФ одинаковы, получаем результаты, приведенные в табл. 1.

Таблица 1

Среднее значение для контрольного бульона: 312 Бульон + АТФ : 311310289205 *Проба 1*: 1:10 3941 1:10 + АТФ 6438 1:100 196188 1:100 + АТФ 183525189788 1:1000 316294 1:1000 + АТФ 325553276517
Проба 2: 1:10 266264 1:10 + АТФ 292550275292 1:100 349314 1:100 + АТФ 266468252126 1:1000 346334 1:1000 + АТФ 319980305035

4.2. Обработка данных

Для получения результатов исследования пробы, полученные первичные данные СЛЕДУЕТ ввести в специально подготовленную таблицу MS Excel. Эта таблица состоит из трех отдельных листов, каждый из которых предназначен для одного разведения, т. е. 1 : 10 (–1), 1 : 100 (–2) или 1 : 1000 (–3), и обработки данных для одной пробы (продукта или сырья).

При необходимости тестирования нескольких проб СЛЕДУЕТ заполнять новую таблицу для каждой пробы.

4.2.1. Ввод сведений.

Используя таблицу, следует ввести все сведения в предназначенные для них ячейки (рис. 2).

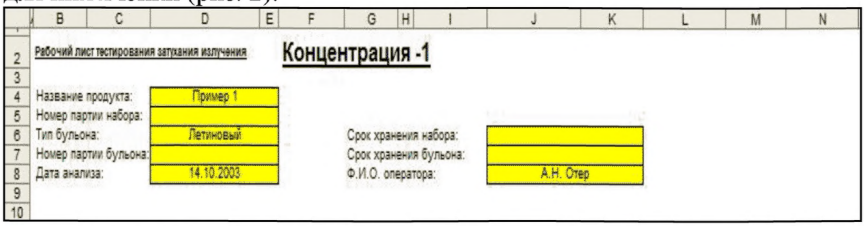


Рис. 2. Пример сведений, которые следует заводить в верхние ячейки таблицы

Необходимо заполнить как можно больше сведений, чтобы было ясно, *что* тестировалось, *когда* и с использованием каких реактивов/приборов.

4.2.2. Ввод данных.

4.2.2.1. Данные о бульоне.

Нужно ввести все необходимые результаты для проб с разбавлением 1 : 10 в соответствующие ячейки таблицы (рис. 3).

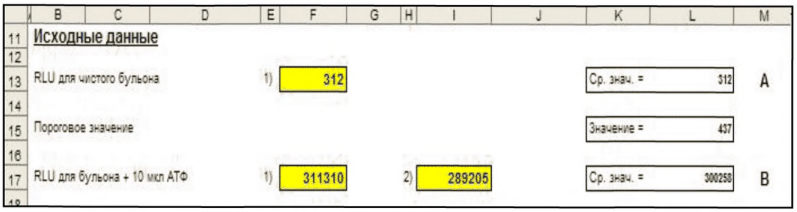


Рис. 3. Пример данных, необходимых для контрольных бульонов

Средние и пороговые значения вычисляются автоматически благодаря заведенным в ячейки формулам, и эти значения будут одинаковы для каждого листа. Эти данные должны быть скопированы в соответствующие места других рабочих листов; если это не произойдет автоматически, то необходимо ввести данные вручную.

NB: Если разность значений составляет > 20 % среднего значения, то полученное число будет красного цвета. Эту часть теста СЛЕДУЕТ повторить.

4.2.2.2. Данные о пробе.

Необходимо ввести все остальные необходимые сведения / результаты, касающиеся пробы, в соответствующие ячейки таблицы (см. рис. 4, приведенный ниже). Следует повторить эту операцию для каждого разведения пробы, т. е. 1 : 10 (–1), 1 : 100 (–2) и 1 : 1000 (–3).

NB: Если разность значений составляет > 20 % среднего значения, то полученное число будет красного цвета.

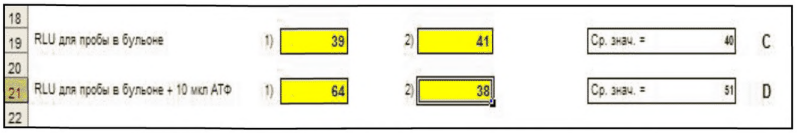


Рис. 4. Пример необходимых дополнительных данных

5. ИСХОДНЫЕ И КОНЕЧНЫЕ ДАННЫЕ

5.1. Содержит ли проба АТФ не бактериального происхождения?

Данные, введенные в таблицу, изменяют ячейки, содержащие уравнения (рис. 5).

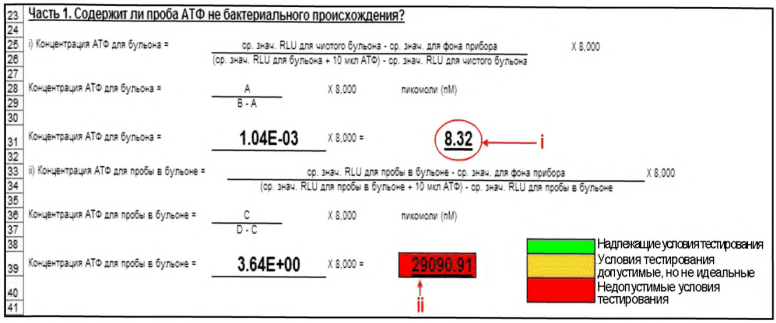


Рис. 5. Пример расчета для определения содержания АТФ не бактериального происхождения

Значение, помеченное знаком **i** на приведенном выше рис. 5 – это концентрация АТФ в контрольном бульоне (пМ), а значение, помеченное знаком **ii** – это концентрация АТФ в пробе, находящейся в контрольном бульоне.

При проведении этого теста предполагается, что проба не загрязнена, поэтому любая разница между **i** и **ii** приписывается концентрации АТФ, содержащегося в пробе.

Если значение **ii** значительно больше значения **i** (т. е. >1.4x), и обнаружено, что проба *не* ингибирует реакцию биолюминисценции (см. раздел 5.2), то предполагается, что АТФ не бактериального происхождения составляет значительную часть АТФ (и значит, загрязнение отсутствует), и поэтому проба **не пригодна** для проведения тестирования АТФ.

Ячейка, содержащая значение, помеченное знаком **ii**, автоматически изменяет цвет, указывая, не содержит ли проба слишком большое количество натурального АТФ.

5.2. Ингибирует ли проба реакцию биолюминисценции?

Наличие АТФ определяется по свету, испускаемому при гидролизе АТФ до АМФ, который отдает энергию в виде зеленого света (фермен-

том, катализирующим эту реакцию, является люцифераза). Некоторые пробы могут изменять эту реакцию или эмиссию света в результате этой реакции.

В конечной части рабочего листа определяется, оказывает ли проба какое-либо влияние на реакцию биолюминисценции. Это определяется по способности пробы в бульоне испускать свет в результате гидролиза АТФ, выраженной в % к аналогичной способности самого бульона.

Желаемый результат должен быть как можно более близким к 100 %. Падение ниже 100 % означает, что сырье/продукт каким-то образом тормозит реакцию, и света излучается меньше, чем в чистом бульоне.

Это может препятствовать определению загрязнения при обычном тестировании АТФ.

Если полученное значение превышает 100 %, это означает, что проба усиливает испускание света. Слишком большое усиление может привести к ложным положительным результатам при обычном тестировании АТФ.

Практически невозможно найти материал, для которого бы значение составляло 100 %. В большинстве случаев получается значение больше или меньше 100 %. Поэтому была создана шкала диапазонов процентных значений, используя которую можно определить, оказывает ли проба значительное влияние.

Значения рассчитываются с помощью табл. 2 и появляются в окрашенной ячейке. Цвет ячейки зависит от процентного значения (табл. 2).

Таблица 2

ЗЕЛЕНЫЙ	(> 75 % и < 115 %) = идеальный результат
ЖЕЛТЫЙ	(26 % до 75 % и 115 % до 125 %) = приемлемый результат
КРАСНЫЙ	(< 25 % и > 125 %) неприемлемый результат

5.3. Интерпретация результатов

После введения всех данных тестирования в таблицу результаты для трех разведений отображаются в нижней части таблицы (рис. 6).

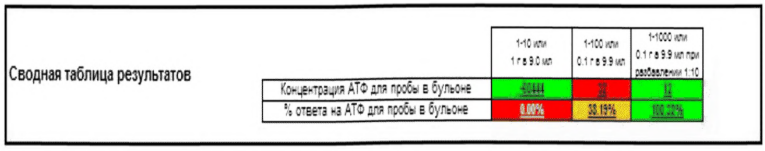


Рис. 6. Сводная таблица результатов, показывающих эффекты пробы

Эта сводная таблица (рис. 6) составлена для того, чтобы пользователь быстро определил наилучшие условия тестирования, как представено ниже в таблице 3.

Таблица 3

1-й вариант Концентрация АТФ для пробы в бульоне = Зеленый % ответа на АТФ для пробы в бульоне = Зеленый
2-й вариант Концентрация АТФ для пробы в бульоне = Желтый % ответа на АТФ для пробы в бульоне = Зеленый
3-й вариант Концентрация АТФ для пробы в бульоне = Зеленый % ответа на АТФ для пробы в бульоне = Желтый
4-й вариант Концентрация АТФ для пробы в бульоне = Желтый % ответа на АТФ для пробы в бульоне = Желтый

Чем ближе это значение к 100 %, тем меньше проба влияет на течение реакции биолюминисценции.

Если результат на этом этапе окрашен в желтый цвет, то его приемлемость или неприемлемость определяется микробиологом, являющимся специалистом по методике определения АТФ. Однако, в общем случае, если приемлемость результата является неопределенной (т. е. цвет желтый), а результат определения концентрации АТФ для пробы в бульоне окрашен в зеленый цвет, то проба считается приемлемой.

Если ни одна из концентраций (1 : 10, 1 : 100 или 1 : 100) не дает приемлемого значения, и/или концентрация АТФ для пробы в бульоне является высокой, то проба не пригодна для тестирования с использова-

нием метода определения АТФ. Для такой пробы следует применять классический метод определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов.

6. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

Сбор, обезвреживание, хранение и уничтожение (утилизация) должны осуществляться способами, безопасными для здоровья и среды обитания в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации в области обращения с отходами производства и потребления. Вывоз отходов осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности.

7. БЕЗОПАСНОСТЬ

АТФ имеется во всех живых клетках, поэтому очень важно, чтобы все операторы принимали меры предосторожности для обеспечения того, чтобы пробы не загрязнялись из внешних источников АТФ. Для получения правильных результатов при использовании этих методик необходимо проводить микробиологические тренинги, особенно тренинги по методикам обеспечения стерильности. При проведении тестов, описанных в этом документе, необходимо соблюдать правила общей безопасности. При работе согласно описанным методикам СЛЕДУЕТ использовать медицинский халат, защитные очки и защитные перчатки. До и после работы согласно методикам рабочее место следует дезинфицировать, а, покидая рабочее место, следует тщательно вымыть руки.

Библиографические данные

1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2. СанПиН 1.2.681—97 «Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции».

3. МУК 4.2.801—99 «Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции».

4. ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологичских анализов».

5. ГОСТ 26670—91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов».

6. ГОСТ 10444.1—84 «Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологичском анализе».

7. Ефременко Е. Н., Азизов Р. Э., Махлис Т. А., Аббасов В. М., Варфоломеев С. Д. «Определение биолюминесцентным методом минимальных ингибирующих концентраций веществ по отношению к бактериям, участвующим в биокоррозии». 2005, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119992.

8. Сведения о приборах, расходных материалах, средах на сайтах в интернете:

http://www.lumtek.ru/bioluminescence/

gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

9. Сеземин И. А. «Применение экспресс метода АТФ люминометрии при санитарно-гигиенических исследованиях в пищевой промышленности». Пищевая промышленность, 3/2007

10. Константинова С. «Люцифераза помогает считать бактерии». ИР 12(684), 2006.

gost.e-ecolog.ru