4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Проведение санитарно-бактериологического анализа продовольственного сырья, пищевых продуктов, воды и смывов с поверхностей с использованием бактериологического экспресс-анализатора

Методические указания
МУК 4.2. 581 - 96

Издание официальное

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.23
П78

П78 **Проведение** санитарно-бактериологического анализа продовольственного сырья, пищевых продуктов, воды и смывов с поверхностей с использованием бактериологического экспресс-анализатора: Методические указания.–М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1997.–32 с.

ISBN 5—7508—0076—8

1. Разработаны:
Центром государственного санитарно-эпидемиологического надзора Медицинского центра Управления делами Президента Российской Федерации: к.м.н. В. П. Тулупов, к.м.н. О. М. Чекмарев, к.м.н. С. В. Чанков, Н. Е. Тулянкина;
Центром государственного санитарно-эпидемиологического надзора Магаданской области: к.м.н. В. Р. Саухат, Т. А. Каплан, А. А. Гончаренко;
Фирмой "SYRUS SYSTEMS Ltd.": к.б.н. Т. Б. Макарова, к.м.н. С. В. Юров.
2. Утверждены и введены в действие Первым заместителем Председателя Госкомсанэпиднадзора России – Заместителем Главного государственного санитарного врача Российской Федерации 29 октября 1996 г.
3. Введены впервые

ББК 51.23

Редакторы Акопова Н.Е., Максакова Е.И.
Технические редакторы Ханский Р.В., Ломанова Е.В.

Подписано в печать 11.03.97

Формат 60x88/16 Печ. л. 2.0

Тираж 500 экз. Заказ 53

ЛР № 020877 от 20.05.94 г.
Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Информационно-издательским центром Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11

ISBN 5—7508—0076—8

© Информационно-издательский центр Минздрава России

СОДЕРЖАНИЕ

1. Область применения 4
2. Общие положения 5
3. Определяемые с помощью бактериологического экспресс-анализатора "РЭБИТ" микробиологические показатели по отдельным группам пищевых продуктов, воды и смывов 7
4. Протоколы исследований основных групп санитарно-значимых микроорганизмов 13
4.1. Общие положения 13
4.1.1. Приготовление образца 13
4.1.2. Исследования на анализаторе "РЭБИТ" 13
4.2. Процедуры специфических методов исследования на анализаторе "РЭБИТ" 14
4.2.1. Определение общей микробной обсемененности (ОМЧ) 14
4.2.2. Определение колиформных бактерий 18
4.2.3. Определение энтеробактерий 18
4.2.4 Определение Грам(-)-бактерий 18
4.2.5. Определение псевдомонад 19
4.2.6. Определение анаэробных микроорганизмов 19
4.2.7. Определение дрожжей и плесеней 19
4.2.8. Скрининговое определение сальмонелл в соответствии с Британским стандартным методом 20
4.2.9. Скрининговое определение сальмонелл - альтернативный метод 21
4.2.10. Определение Staphylococcus aureus 21
4.2.11. Скрининговое определение E.coli 22
4.3. Запись результатов исследования 22
4.4. Интерпретация результатов исследования 23
4.5. Примеры протоколов исследований на анализаторе "РЭБИТ" 25
5. Инструкция по приготовлению питательных сред 29
6. Приложение 31
6.1. Методы обработки измерительных ячеек 31
6.2. Приготовление измерительных ячеек для непрямого метода 32

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Председателя
Госкомсанэпинадзора России – Заместитель
Главного государственного санитарного врача Российской Федерации
_____С. В. Семенов
"29" октября 1996 г.

Дата введения – с момента утверждения

Проведение санитарно-бактериологического анализа продовольственного сырья, пищевых продуктов, воды и смывов с поверхностей с использованием бактериологического экспресс-анализатора

Методические указания
МУК 4.2.581–96

1. Область применения

Методические указания предназначены для центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора и других организаций, осуществляющих контроль за качеством сырья, продуктов питания, воды и смывов с поверхностей и имеющих в своем распоряжении бактериологический экспресс-анализатор "РЭБИТ".

Издание официальное

2. Общие положения

Для успешного выполнения задач, стоящих перед службой санитарно-эпидемиологического надзора в рамках обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, и экспрессного проведения бактериологических исследований пищевых продуктов, воды, фармпрепаратов, косметических изделий и других объектов окружающей среды необходимы современные автоматизированные экспресс-системы бактериологического анализа, позволяющие повысить качество, экспрессность и достоверность лабораторных исследований, разработать и внедрить новые методы микробиологического анализа.

Классический метод микробиологического анализа является длительным и трудоемким, зачастую по результатам метода можно давать лишь ретроспективную оценку микробиологической безопасности исследуемых объектов.

Применение бактериологического экспресс-анализатора "РЭБИТ" – прибора принципиально новой конструкции для полностью автоматизированного обнаружения микробной контаминации и роста различных микроорганизмов – обеспечит гарантию качества и увеличит эффективность проводимых бактериологических исследований. Благодаря непрерывной регистрации изменения электрических параметров среды, меняющихся вследствие метаболизма микроорганизмов, и полностью автоматизированному процессу сбора и обработки данных, степень микробного загрязнения можно определить через несколько часов.

Принцип действия данного прибора основан на регистрации изменения импеданса (сопротивления) питательной среды прямым и непрямым путем. Рост микроорганизмов приводит к изменению концентрации ионов в питательной среде вследствие метаболизма, приводя, тем самым, к изменению сопротивления питательной среды в заданном интервале времени.

В практике отечественной микробиологии на сегодняшний день известны два прибора подобного типа – "БакТрак 4100" и "Бактометр", основанные также на измерении импеданса в процессе роста микроорганизмов. Отличительной особенностью прибора "РЭБИТ" является высокая стабильность поддержания температуры, развитое программное обеспечение в среде Windows™, возможность использования отечественных питательных сред, многоразовые измерительные ячейки.

Прошедший аттестацию и имеющий Сертификат Госстандарта РФ № 1056 от 5 июля 1996 г., прибор "РЭБИТ" может быть использован как в практических бактериологических лабораториях центров Госсанэпиднадзора, так и в производственных лабораториях предприятий, выпускающих пищевую, молочную, косметическую, фармацевтическую и другую продукцию.

Настоящие Методические указания имеют целью способствовать внедрению в практику санитарно-эпидемиологической службы РФ современных, автоматизированных систем для ускоренного определения показателей микробиологической безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, совершенствованию нормативно-технической документации.

Методические указания включают в себя:

- определяемые с помощью прибора "РЭБИТ" микробиологические показатели по отдельным группам пищевых продуктов, воды, косметических изделий и других объектов;
- протоколы исследований основных санитарно-значимых показателей (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – ОМЧ, Грам(-)-бактерий, псевдомонад, энтеробактерий, колиформных бактерий, в т. ч. E. coli, сальмонелл, анаэробных бактерий, дрожжей/плесеней, золотистого стафилококка;
- приготовление питательных сред;
- методы обработки измерительных ячеек;
- приготовление измерительных ячеек для непрямого метода.

Нижеприведенные перечни определяемых микроорганизмов в различных продуктах отражают проводимые исследования объектов окружающей среды при использовании бактериологического экспресс-анализатора "РЭБИТ" и, по некоторым продуктам, не содержат всех контролируемых групп микроорганизмов, заложенных в "Медико-биологических требованиях № 5061-89" (например, в ряде продуктов детского питания контролируется количество Bac. cereus в 1 г и в большей массе продукта, чем отсутствие БГКП).

Методы отбора проб, транспортирования, приготовление разведений, используемое оборудование (за исключением специального оборудования, необходимого для работы на анализаторе "РЭБИТ"), посуда и прочее излагаются в соответствующих ГОСТах, методических указаниях, инструкциях.

Порядок установки, запуска и работы на анализаторе "РЭБИТ", а также необходимые для анализа аксессуары определены в "Инструкции пользователя", предоставляемой фирмой "SYRUS SYSTEMS Ltd." при поставке оборудования.

3. Определяемые с помощью бактериологического экспресс-анализатора "РЭБИТ" микробиологические показатели по отдельным группам пищевых продуктов, воды и смывов

Наименование продукта	Определяемые показатели
Молоко пастеризованное	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы
Кисломолочные продукты	1. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 2. Сальмонеллы
Молоко и молочные изделия сухие	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы
Консервы молочные	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы * Промышленную стерильность определяют в соответствии с "Инструкцией о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания", утв. ГКСЭН РФ № 01-19/9-11 от 21.07.92
Сыры и творожные изделия	1. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 2. Staphylococcus aureus 3. Сальмонеллы
Мясо мороженое	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы

Наименование продукта	Определяемые показатели
Мясные вареные и запеченные продукты	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы
Готовые мясные рубленные изделия, студни, паштеты, соусы и т. п.	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Staphylococcus aureus 5. Энтерококки
Продукты переработки мясного пищевого сырья	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Мезофильные сульфитредуцирующие клостридии 4. Staphylococcus aureus 5. Сальмонеллы
Колбасные изделия	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек - БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Сульфитредуцирующие клостридии
Консервы мясные и мясорастительные	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Staphylococcus aureus 3. Сальмонеллы 4. Мезофильные сульфитредуцирующие клостридии * Промышленную стерильность определяют в соответствии с "Инструкцией о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания", утв. ГКСЭН РФ № 01-19/9-11 от 21.07.92

Наименование продукта	Определяемые показатели
	Примечание: *В случае обнаружения клостридий анализируют и устанавливают классическим методом отсутствие в них возбудителей ботулизма, ботулинического токсина и C. perfringens*
Яйцо и продукты яичные	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Staphylococcus aureus
Рыба свежая, охлажденная и мороженая. Рыба копченая. Кулинарные изделия из рыбы	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Staphylococcus aureus
Икра, моллюски, ракообразные и другие продукты моря	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Staphylococcus aureus 5. Мезофильные сульфитредуцирующие клостридии 6. Дрожжи, плесени
Кондитерские сахаристые изделия	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Дрожжи, плесени
Кондитерские мучные изделия	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Staphylococcus aureus 5. Дрожжи, плесени

Наименование продукта	Определяемые показатели
Овощи сухие	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы
Фрукты сухие	1. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 2. Сальмонеллы 3. Staphylococcus aureus 4. Плесени
Специи и пряности	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Мезофильные сульфитредуцирующие клостридии 5. Плесени
Консервированные фрукты, ягоды, овощи и грибы	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Мезофильные сульфитредуцирующие клостридии 5. Плесени * Промышленную стерильность определяют в соответствии с "Инструкцией о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания", утв. ГКСЭН РФ № 01-19/9-11 от 21.07.92 **Примечание**: *В случае обнаружения клостридий анализируют и устанавливают классическим методом отсутствие в них возбудителей ботулизма, ботулинического токсина и C. perfringens*
Продукты переработки растительных масел (майонез, маргарин)	1. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 2. Сальмонеллы 3. Дрожжи, плесени

Наименование продукта	Определяемые показатели
Масла животные	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы
Питьевые минеральные воды	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы
Напитки на настоях и эссенциях	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы
Пиво	1. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 2. Сальмонеллы
Концентраты молочные	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Мезофильные сульфитредуцирующие клостридии
Кулинарные изделия, готовые блюда и полуфабрикаты	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы 4. Staphylococcus aureus

Наименование продукта	Определяемые показатели
Продукты для здоровых детей раннего возраста • продукты на молочной основе • продукты на зерновой основе • овощи молочные и плодово-молочные смеси	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Staphylococcus aureus 4. Сальмонеллы 5. Дрожжи, плесени
Продукты для здоровых детей раннего возраста • плодово-ягодные и плодово-вощные консервы • мясные консервы • рыбные консервы	* Промышленную стерильность определяют в соответствии с "Инструкцией о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания", утв. ГКСЭН РФ № 01-19/9-11 от 21.07.92 **Примечание**: *В случае обнаружения клостридий анализируют и устанавливают классическим методом отсутствие в них возбудителей ботулизма, ботулинического токсина и C. perfringens*
Специализированные продукты для лечебного питания детей	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Staphylococcus aureus 4. Сальмонеллы 5. Дрожжи, плесени
Вода питьевая	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 мл 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Сальмонеллы

Наименование продукта	Определяемые показатели
Смывы с объектов общественного питания, торговой сети, пищеблоков различных учреждений и т. д.	1. Количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г 2. Бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформные бактерии) 3. Staphylococcus aureus 4. Сальмонеллы

4. Протоколы исследований основных групп санитарно-значимых микроорганизмов с использованием бактериологического экспресс-анализатора "РЭБИТ"

Процедура проведения анализа с использованием бактериологического анализатора "РЭБИТ":

4.1. Общие положения

4.2. Приготовление образца

4.1.1.1. Жидкие образцы, такие как вода, молоко, фруктовые соки, не требуют специальной подготовки, хотя могут быть сделаны разведения, описанные ниже. Твердые образцы требуют гомогенизации и разведения.

4.1.1.2. Чтобы приготовить твердый образец в гомогенном виде, необходимо: сделать навеску 10 или 25 г образца в стерильном пакете для гомогенизатора типа Stomacher. Добавьте стерильный разбавитель (обычно Maximum Recovery Diluent – MRD или физиологический раствор, ЗФР) так, чтобы общий вес образца был 100 или 250 г (разведение 1 : 10) и поместите пакет с образцом и разводящей жидкостью в гомогенизатор. Гомогенизируйте образец.

4.1.1.3. Небольшое количество образца может быть подвергнуто разведению при помещении 1 г образца в стерильные стандартные флаконы с 9 мл стерильной разводящей жидкости.

Если необходимо дальнейшее разведение, то оно может быть сделано серийным титрованием при пипетировании 1 мл из предварительного разведения в 9 мл стерильного разбавителя (обычно MDR) и перемешиванием (например, с помощью Vortex Mixer).

4.1.2. *Исследования на анализаторе "РЭБИТ"*

4.1.2.1. Два типа исследований возможно использовать на системе "РЭБИТ":

- прямой метод, когда питательная среда и образец добавляются непосредственно в стерильную измерительную ячейку с рабочим объемом 2—10 мл;
- непрямой метод, когда культуральная среда и образец добавляются в стерильную боросиликатную стеклянную пробирку с рабочим объемом до 5 мл. Стеклянная пробирка затем помещается в измерительную ячейку, которая затем плотно закрывается.

4.1.2.2. Приготовление ячеек для непрямого метода описано в приложении.

4.1.2.3. При проведении исследований на анализаторе "РЭБИТ" рекомендуется в качестве положительного контроля включать референс-штаммы микроорганизмов. Данные микроорганизмы должны быть выращены в бульонной культуре и серийно разведены в MRD до 10^{-6}. 1 мл из наибольшего разведения добавляется в измерительную ячейку с питательной средой и инкубируется в модуле анализатора "РЭБИТ" с исследуемыми образцами.

4.1.2.4. Каждое исследование на анализаторе "РЭБИТ" должно включать контрольную ячейку со стерильной питательной средой (отрицательный контроль).

4.1.2.5. После установления в модули анализатора "РЭБИТ" ячеек с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями, ячейки инкубируются в модулях в соответствии с заданным Кодом Исследования, описанным ниже.

4.1.2.6. Типичные Коды Исследования представлены в п. п. 4.1.2.7. и привязаны к специфическим видам исследования, описанным ниже.

4.1.2.2. Типичные Коды Исследования для системы РЭБИТ

Таблица 1

Номер кода исследования	Продолжительность исследования, ч	Интервал, мин	Критерий детекции, uS	Температура, °С
1	24	6	+5	30
2	24	6	+5	37
3	24	6	+20	37
4	24	6	–10	37
5	48	6	–10	30
6	96	12	–15	30
7	24	6	–30	43
8	24	6	–10	37
9	24	6	–10	30

4.2. Процедуры специфических методов исследования на анализаторе "РЭБИТ"

4.2.1. Определение общей микробной обсемененности (ОМЧ)

4.2.1.1. Для молока и свежих пищевых продуктов с высоким или промежуточным уровнем влажности должен быть использован прямой метод.

4.2.1.2. Приготовьте образцы, как указано в разделе 4.1.1.

4.2.1.3. Добавьте 1 мл приготовленного образца в измерительную ячейку с 4 мл среды WIB.

4.2.1.4. В качестве референс-штаммов используйте E. coli или S. aureus.

4.2.1.5. Инкубируйте в модуле анализатора "РЭБИТ" в соответствии с Кодом Исследования 1.

4.2.1.6. Для сухих и большинства других типов образцов должен быть использован непрямой метод.

4.2.1.7. Приготовьте образцы в соответствии с разделом 1.1.

4.2.1.8. Добавьте 1 мл образца к 4 мл TSB или CB в 5-мл пробирку для непрямого метода.

4.2.1.9. В качестве референс-штаммов используйте E.coli или S.aureus.

4.2.1.10. Инкубируйте в модуле анализатора "РЭБИТ" в соответствии с Кодом Исследования 9.

4.2.1.11. Оба описанных метода при построении калибровочной кривой должны быть сравнены с результатами классического метода на чашках с использованием PCA (питательный агар).

** Пример построения калибровочного файла, сформированного при исследовании обсемененности молока*

Пробы молока были исследованы на общую обсемененность (МАФАМ) классическим методом в соответствии с ГОСТом 9225-84 "Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа." Параллельно, соответствующие образцы молока без предварительного разведения были исследованы на анализаторе "РЭБИТ" в соответствии с вышеупомянутым протоколом. Результаты классического метода (КОЕ/мл) и данные, полученные на анализаторе "РЭБИТ" (время определения – в часах и минутах) были внесены в память компьютера "РЭБИТ". Данные представлены в таблице 2.

На основании введенных данных автоматически анализатором "РЭБИТ" строится количественная зависимость между данными классического метода и результатами, полученными на анализаторе. Данные представлены на рис. 1.

Калибровочному графику оператор присваивает имя, идентичное имени кода исследования для молока, например, FI02TC.

После сохранения данных в последующей работе при исследовании молока оператор выбирает код исследования с именем F102TC, после чего анализатор "РЭБИТ" автоматически, при обнаружении роста, выдает концентрацию МАФАМ в образце.

Более подробно построение и использование калибровочного файла изложено в "Бактериологическом анализаторе "РЭБИТ". Инструкция пользователя." М., 1996.

Таблица 2

Результаты сравнительной оценки данных, полученных на анализаторе "РЭБИТ", и классическим методом при определении уровня общей обсемененности молока

CFU/ML	HH:MM	CFU/ML	HH:MM	CFU/ML	HH:MM	CFU/ML	HH:MM	CFU/ML	HH:MM
2.3 E5	07:00	3.5 E5	06:24	3.3 E5	06:12	8.9 E3	09:30	2.8 E4	09:12
3.4 E4	08:54	3.9 E4	08:30	4.6 E2	11:48	1.6 E3	11:30	2.6 E3	11:06
1.4 E2	13:48	6.2 E1	12:42	3.1 E2	12:12	4.3 E2	12:18	2.1 E1	13:36
2.8 E4	07:06	4.9 E4	07:48	5.8 E4	07:48	1.0 E5	07:18	2.5 E3	10:36
4.6 E3	10:12	8.7 E3	09:36	1.5 E4	09:24	3.1 E2	12:24	4.8 E2	12:12
6.0 E2	12:06	7.7 E2	11:24	2.1 E1	13:18	2.3 E2	13:06	9.1 E4	06:48
1.6 E5	06:12	1.8 E5	06:00	2.7 E5	05:42	7.2 E3	09:24	5.0 E3	08:42
1.2 E4	08:36	2.1 E4	08:24	7.5 E2	11:48	1.1 E3	10:42	2.4 E3	10:18
4.1 E3	10:06	1.2 E2	12:48	1.0 E2	12:18	2.3 E2	12:42	3.1 E2	11:24
2.1 E1	14:12	6.2 E1	14:00						
2.5 E7	03:22	1.5 E6	05:10	6.5 E6	04:10	2.4 E6	01:40		

Примечание:

CFU/ml – количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемого вещества;

HH:MM – время регистрации (часы:мин) роста микроорганизмов, определенных анализатором "РЭБИТ";

E -- показатель степени.

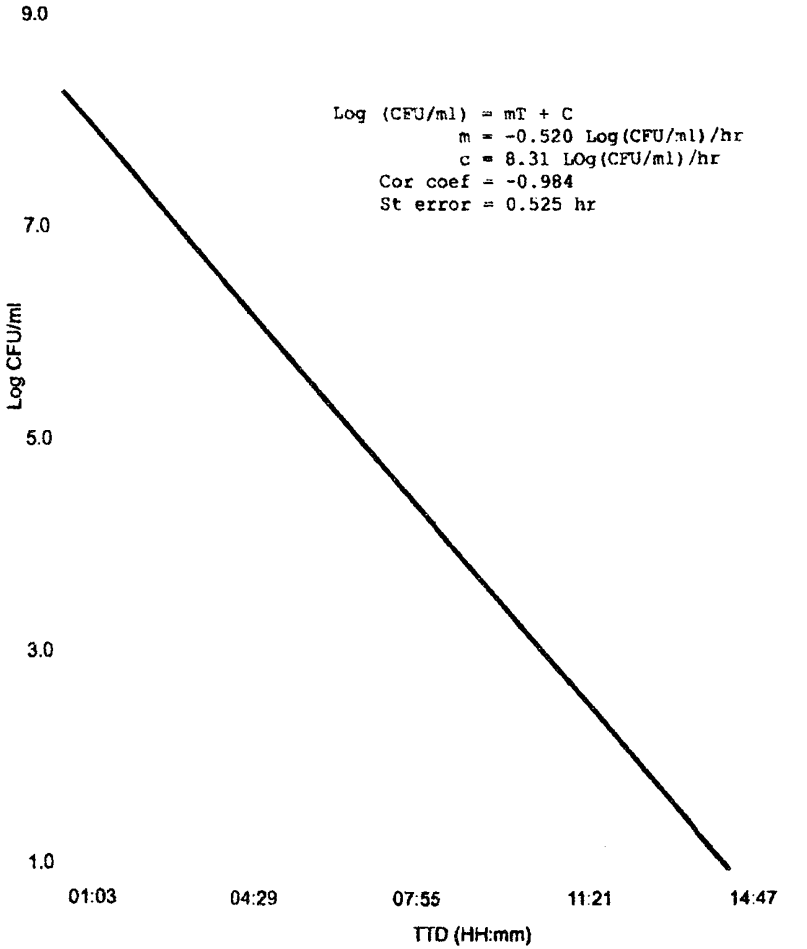


Рис. 1. *Зависимость между результатами определения общей микробной обсемененности молока, полученными на анализаторе "РЭБИТ", и данными классического метода на чашках Петри.*

По оси ординат – логарифм КОЕ/мл, определенных классическим методом.

По оси абсцисс – время регистрации роста микроорганизмов, определенных на анализаторе "РЭБИТ".

4.2.2. Определение колиформных бактерий

4.2.2.1. Приготовьте образцы в соответствии с разделом 4.1.1.

4.2.2.2. В зависимости от условий может быть использован прямой или непрямой методы исследования.

4.2.2.3. В случае использования прямого метода, добавьте 1 мл приготовленного разведенного образца в измерительную ячейку с 9 мл среды WMB (среда MacConkey).

4.2.2.4. В качестве положительного контроля используйте E. coli, в качестве отрицательного – S. aureus.

4.2.2.5. Инкубируйте в модуле анализатора "РЭБИТ" в соответствии с Кодом Исследования 2.

4.2.2.6. Для непрямого метода, добавьте 1 мл приготовленного образца в 5-мл стеклянную пробирку с 4 мл среды COL-ECO Test Broth (MUG E.coli Broth -G10014) – среда на колиформы.

4.2.2.7. В качестве положительного контроля используйте E. coli, в качестве отрицательного – S. aureus.

4.2.2.8. Инкубируйте в модуле анализатора "РЭБИТ" в соответствии с Кодом Исследования 8.

4.2.2.9. Для контроля результатов исследования может быть использован метод высева на чашках со средой VRBA или средой Эндо.

4.2.3. Определение энтеробактерий

4.2.3.1. Приготовьте образцы в соответствии с разделом 4.1.1.

4.2.3.2. Добавьте 1 мл приготовленного образца в измерительную ячейку с 9 мл среды WEB (среда для определения энтеробактерий).

4.2.3.3. В качестве положительного контроля используйте E. coli, в качестве отрицательного – S. aureus.

4.2.3.4. Инкубируйте в модуле анализатора "РЭБИТ" в соответствии с Кодом Исследования 1.

4.2.3.5. Для контроля результатов исследования может быть использован метод высева на чашках со средой VRBA с глюкозой или средой Эндо.

4.2.4. Определение Грам(-)-бактерий

4.2.4.1. Процедура описанная в разделе 1.2.3. может быть использована для определения Грам(-)-бактерий со следующими изменениями.

4.2.4.2. Используйте WGNB (среда для определения Грам(-)-бактерий) вместо WEB.

4.2.4.3. Как правило, можно не проводить сравнения с методом посева на чашки Петри.

4.2.5. Определение псевдомонад

4.2.5.1. Приготовьте образец в соответствии с разделом 4.1.1.

4.2.5.2. Добавьте 1 мл приготовленного образца в стеклянную 5-мл пробирку для непрямого метода с 4 мл среды GN2 (среда для определения псевдомонад).

4.2.5.3. В качестве положительного контроля используйте Pseudomonas aeruginosa.

4.2.5.4. Инкубируйте образец в модуле в соответствии с Кодом Исследования 5.

4.2.5.5. Увеличение селективности среды GN2 может быть достигнуто при использовании доступных антибиотиков в качестве добавок.

4.2.5.6. При получении положительных результатов на анализаторе "РЭБИТ" они могут быть подтверждены субкультивированием и дальнейшей идентификацией при необходимости определения специфических видов псевдомонад.

4.2.6. Определение анаэробных микроорганизмов

4.2.6.1. Приготовьте образец в соответствии с разделом 4.1.1.

4.2.6.2. Добавьте 1 мл приготовленного образца в измерительную ячейку с 9 мл среды WAB (среда для определения анаэробов).

4.2.6.3. В качестве положительного контроля используйте Clostridium sporogenes.

4.2.6.4. Инкубируйте образец в модуле анализатора "РЭБИТ", в соответствии с Кодом Исследования 1.

4.2.6.5. Если необходим количественный учет анаэробных микроорганизмов для построения калибровочного файла, используйте доступную среду для высева на чашки Петри анаэробных бактерий.

4.2.6.6. Селективность среды WAB для облигатных анаэробов может быть улучшена при добавлении неомицина в концентрации 75 мг/л.

4.2.6.7. Калибровочная кривая для анализатора "РЭБИТ" может быть построена при сопоставлении результатов, полученных на анализаторе и на чашках Петри со средой Fastidious Anaerobe Agar или другой доступной средой.

4.2.7. Определение дрожжей и плесеней

4.2.7.1. Приготовьте образец в соответствии с разделом 4.1.1.

4.2.7.2. Для пищевых образцов добавьте 1 мл приготовленного образца в 5-мл стеклянную пробирку для непрямого метода с 4 мл среды Wort Broth (среда для определения дрожжей и плесеней).

4.2.7.3. Для непищевых образцов добавьте 1 мл приготовленного образца в 5-мл стеклянную пробирку для непрямого метода с 4 мл среды SLM (жидкая среда Сабуро с 2 %-ной декстрозой).

4.2.7.4. Если наибольшее значение имеет определение *плесеней*, то используется твердая питательная среда, обычно SDA (агар Сабуро с декстрозой).

4.2.7.5. Приготовление косяка агаровой среды в пробирках для непрямого метода описано в приложении.

4.2.7.6. Внесите 0,1 мл приготовленного образца на скошенную поверхность агара в пробирке для непрямого метода.

4.2.7.7. В качестве положительного контроля используйте следующие виды микроорганизмов:

Wort Broth	– Saccharomyces cerevisiae
SLM	– Candida albicans
SDA	– Aspergillus niger

4.2.7.8. Инкубируйте образцы в модуле в соответствии с Кодом Исследования 6.

4.2.7.9. Результаты анализов могут быть подтверждены при определении дрожжей и плесеней высевом на чашки Петри со средами SDA, Rose Bengal Chloramphenicol Agar или другими доступными средами для определения данных групп микроорганизмов.

4.2.8. Скрининговое определение сальмонелл в соответствии с Британским стандартным методом

4.2.8.1. Асептически сделайте навеску 25 г образца в стерильном пакете для гомогенизатора.

4.2.8.2. Добавьте стерильный ЗФР с глюкозой (5 г/л) и лизином (10 г/л) до 250 г (разведение 1 : 10).

4.2.8.3. Инкубируйте образец в пакетах для гомогенизатора при 37 °С в течение 18—24 ч

4.2.8.4. Добавьте 0,1 мл предварительно инкубированного образца в пакетах для гомогенизатора в измерительные ячейки с 2 мл среды EG (среда Easter-Gibson для определения сальмонелл).

4.2.8.5. В качестве положительного контроля используйте Salmonella typhimurium, в качестве отрицательного – E. coli.

4.2.8.6. Инкубируйте образец в модуле в соответствии с Кодом Исследования 3.

4.2.8.7. Из измерительных ячеек, давших положительный результат на анализаторе "РЭБИТ", сделайте высев на чашки Петри с XLD-агар или висмут-сульфит агар.

4.2.8.8. Инкубируйте чашки с посевным материалом при 37 °С в течение 24 ч и идентифицируйте колонии с черным металлическим блеском (подозрительные на сальмонеллу).

4.2.8.9. Колонии подозрительные на сальмонеллу должны быть изолированы на питательный агар и исследованы серологически с использованием специфических сальмонеллезных антисывороток.

4.2.9. Скрининговое определение сальмонелл – альтернативный метод

4.2.9.1. Асептически сделайте навеску 25 г образца в стерильном пакете для гомогенизатора.

4.2.9.2 Добавьте стерильный ЗФР до 250 г (разведение 1:10).

4.2.9.3. Инкубируйте образец в пакетах для гомогенизатора при 37 °С в течение 18–24 ч.

4.2.9.4. Добавьте 0,1 мл предварительно инкубированного образца в пакетах для гомогенизатора в 5-мл стеклянные пробирки для непрямого метода с 5 мл среды RVS (среда Rappaport-Vassiliadis Splitting для определения сальмонелл – магниевая среда), предварительно подогретой до 43 °С.

4.2.9.5. В качестве положительного контроля используйте Salmonella typhimurium, в качестве отрицательного – E. coli.

4.2.9.6 Инкубируйте образец в модуле в соответствии с Кодом Исследования 7.

4.2.9.7. Из измерительных ячеек, давших положительный результат на анализаторе "РЭБИТ", сделайте высев на чашки Петри с XLD-агар или висмут-сульфит агар.

4.2.9.8. Инкубируйте чашки с посевным материалом при 37 °С в течение 24 ч и идентифицируйте колонии с черным металлическим блеском (подозрительные на сальмонеллу).

4.2.8.9. Подозрительные на сальмонеллу колонии должны быть изолированы на питательный агар и исследованы серологически с использованием специфических сальмонеллезных антисывороток.

4.2.10. Определение Staphylococcus aureus

4.2.10.1. Если требуется количественный учет, приготовьте образец в соответствии с разделом 4.1.1.

4.2.10.2. Если требуется качественный ответ присутствия/отсутствия и очень низкая концентрация S. aureus подозревается в образце, готовится навеска 25 г образца в стерильном пакете для гомогенизатора и добавляется стерильный TSB (Tripticase Soy Broth) до 250 г.

4.2.10.3. Инкубируйте пакет с разведенным и гомогенизированным образцом в течение 24 ч при 30 °С

4.2.10.4. Сделайте посев на скошенную поверхность Baird-Parker агара с яичным желтком и теллуритом калия (приложение), находящегося в 5-мл стеклянных пробирках для непрямого метода, в объеме 0,1 мл предварительно инкубированного образца (TSB/MRD).

4.2.10.5. В качестве положительного контроля используйте S. aureus, отрицательного – E. coli.

4.2.10.6. Инкубируйте образец в модуле в соответствии с Кодом Исследования 4.

4.2.10.7. Содержимое ячеек с положительным результатом должно быть подтверждено соответствующими тестами, например с использованием Staphytect Test набора (Oxoid DR650).

4.2.11. Скрининговое определение E. coli

4.2.11.1. Асептически сделайте навеску образца, в котором регламентируется отсутствие E. coli, в стерильном пакете для гомогенизатора.

4.2.11.2. Добавьте стерильный ЗФР (разведение 1:10).

4.2.11.3. Если масса образца, в котором регламентируется отсутствие E. coli, превышает 1 г, то инкубируйте образец в пакетах для гомогенизатора при 37 °С в течение 18—24 ч. Если масса продукта менее 1 г – предварительное подращивание не требуется.

4.2.11.4. Добавьте 0,1 мл предварительно инкубированного образца в 5-мл стеклянные пробирки для непрямого метода с 5 мл среды COL-ECO Test Broth (MUG E. coli Broth-среда для определения E. coli/колиформ).

4.2.11.5. В качестве положительного контроля используйте E.coli, в качестве отрицательного – S. aureus.

4.2.11.6. Инкубируйте образец в измерительном модуле в соответствии с Кодом Исследования 8.

4.2.11.7. Достаньте пробирки с положительным результатом из анализатора "РЭБИТ" и поместите их под УФЛ с длиной волны 366 нм.

4.2.11.8. Ячейки, имеющие сине-зеленое свечение под УФЛ, рассматриваются как положительные на наличие E. coli.

4.3. Запись результатов исследования

4.3.1. Все исходные данные должны быть записаны в определенном лабораторном журнале.

4.3.2. Система "РЭБИТ" автоматически выдает результаты, выраженные как Время Определения. Данные результаты должны быть распечатаны в форме Test Report (Запись Исследования) и занесены в лабораторный журнал.

4.3.3. Другие результаты, выдаваемые системой "РЭБИТ", также должны быть скопированы в лабораторный журнал для того, чтобы иметь копию исследования. К числу этих данных относятся: Общие Изменения Проводимости, Максимальные Различия между замерами, Наклон Кривой.

4.3.4. Некоторые питательные среды, описанные выше, имеют индикаторы, позволяющие подтвердить положительные результаты, полученные на анализаторе "РЭБИТ". Данные индикаторы вызывают изменение окраски среды.

4.3.5. Все изменения окраски в ячейках анализатора "РЭБИТ" должны быть зафиксированы в лабораторном журнале.

4.3.6. Изменения цвета записываются следующим образом:

Среда	Отрицательный	Положительный
WMB	фиолетовый	желтый
WEB	фиолетовый	желтый
COL-ECO Test Broth (MUG E. coli)	красный	желтый
Baird-Parker	непрозрачно-соломенный	черный на поверхности

4.4. Интерпретация результатов исследования

4.4.1. Детальная информация по интерпретации результатов исследований на анализаторе "РЭБИТ" для конкретных типов исследований отдельных объектов представляется в соответствующих примечаниях к файлам.

4.4.2. Ниже дан список тех наблюдений, которые являются общими при использовании описанных питательных сред.

4.4.3. Whitley MacConkey Broth: Присутствие колиформных бактерий в образце генерирует изменение проводимости, регистрируемое системой "РЭБИТ" в виде представления данных о Времени Определения (TTD) и вызывает изменение цвета среды с фиолетового на желтый.

4.4.4. Whitley Enterobacteriaceae Broth: Присутствие энтеробактерий в образце генерирует изменение проводимости, регистрируемое системой "РЭБИТ" в виде представления данных о Времени Определения (TTD) и вызывает изменение цвета среды с фиолетового на желтый.

4.4.5. COL-ECO Broth (Whitley MUG E. coli Broth): Присутствие колиформных бактерий в образце генерирует изменение проводимости, регистрируемое системой "РЭБИТ" в виде представления данных о Времени

Определения (TTD) и вызывает изменение цвета среды с красного на желтый. Подтверждение E. coli выполняется по вышеописанному критерию плюс флуоресценция образца под действием УФЛ.

4.4.6. Baird-Parker Agar: Присутствие S. aureus в образце генерирует изменение проводимости, регистрируемое системой "РЭБИТ" в виде представления данных о Времени Определения (TTD) и вызывает почернение поверхности агара.

4.4.7. Whitley GN2 Broth: Псевдомонады вызывают особенно сильные изменения сигнала на данном бульоне. Обнаружение зеленого пигмента в бульоне и/или флуоресценция бульона под действием УФЛ, дает предположение о присутствии Ps. aeruginosa. Однако многие другие бактерии и грибы способны также вызывать сильные изменения проводимости среды, если не используются другие селективные агенты.

4.4.8. Корреляция результатов, полученных на анализаторе "РЭБИТ", с результатами, полученными на чашках (функция калибровки анализатора): детали по использованию метода подсчета колоний на чашках при калибровке анализатора "РЭБИТ" представлена в соответствующих примечаниях к файлам.

4.4.9. Некоторые пояснения к ситуации, когда имеет место слабая корреляция между результатами, полученными на анализаторе "РЭБИТ" и классическим методом, может иметь место при несоблюдении данного Протокола исследований. Особое внимание следует обратить на следующие моменты:

- неоптимальная среда может быть выбрана для организмов, присутствующих в образце;
- в образце могут содержаться ингибиторы;
- неудовлетворительный диапазон концентрации микроорганизмов в образце был использован при подсчете колоний на чашках Петри (минимальный диапазон концентраций микроорганизмов должен перекрывать 3 единицы на логарифмической шкале);
- микроорганизмы, находящиеся в образце, могли быть повреждены;
- образцы содержали в высокой пропорции споры бактерий, которые имеют непредсказуемый характер размножения.

Любые рассуждения касательно данных вопросов должны быть занесены в лабораторный журнал.

4.5. Примеры протоколов исследований на анализаторе "РЭБИТ"

4.5.1. Метод определения стафилококка

Общие положения

DWS разработал в своей лаборатории питательную среду, которую можно использовать в непрямом методе, для определения стафилококков. Однако крупномасштабной продажи данной среды не было, и в связи с этим был разработан метод с использованием Baird-Parker агара с теллуритом калия и яичным желтком.

Метод

В стерильные 5-мл стеклянные пробирки для непрямого метода внесите 2 мл стерильного Baird-Parker агара с теллуритом калия и яичным желтком. Агар вносится асептически и пробирка помещается на подставку с наклоном, чтобы образовался косяк агара. На скошенную поверхность агара вносят (0,1—0,5 мл) исследуемого образца и пробирка затем помещается в измерительную ячейку. Исследование проводят в соответствии с протоколом.

Параметры на анализаторе "РЭБИТ":	
Продолжительность исследования	24 ч
Температура	37 °С
Критерий детекции	— 10 uS
Интервал	6 мин

Преимуществом данного метода является возможность пользователей использовать среды в системе "РЭБИТ" аналогичные классическому методу, в связи с чем исключается необходимость тестировать новые среды. При росте микроорганизмов на скошенной поверхности они могут быть проверены в серологическом тесте на Staphylococcus aureus.

4.5.2. Метод определения ГРАМ(-)-бактерий, в т. ч. псевдомонад

Среда - Whitley GN2 Broth (среда для определения Грам (-) – бактерий.

Описание

Среда предназначена для выращивания Грам(-)-бактерий с использованием непрямого метода определения на анализаторе "РЭБИТ". Бульон с низким солевым содержанием. Данная среда использовалась также для определе-

ния псевдомонад. Использование данной среды в фармацевтической индустрии показало способность данной среды определять данные виды бактерий, тогда как другие среды были неэффективны.

При добавлении специфических селективных агентов к данной среде она может быть использована в качестве селективной для определения псевдомонад: добавка X107 – **Ps. aeruginosa**, или X108 – (другие виды **Pseudomonas**).

Состав	г/л	Хранение при 4°С
Источник углеводов	10,0	
K2HPO4	1,0	
KH2PO4	1,0	
сульфат магния	0,4	
остаточные элементы	0,1	pH 7,2

Характеристика среды – прозрачная, бесцветная жидкость.

4.5.3. Определение дрожжей и плесеней на твердой питательной среде

Общие положения

На системе "РЭБИТ" был разработан чувствительный метод определения большинства видов дрожжей с использованием жидкой питательной среды. Однако определение плесеней значительно улучшается при использовании твердой среды, как описано ниже.

Методика исследования

• Суспендируйте необходимое количество агара Сабуро с декстрозой в деионизованной воде в соответствии с инструкцией производителя и нагрейте до кипения до полного растворения.

• Позвольте среде охладиться до, приблизительно, 50 °С и разлейте по 3 мл в боросиликатные пробирки для непрямого метода.

• Закройте пробирки крышками (например, 12 мм алюминиевыми крышками для пробирок фирмы Oxoid) и автоклавируйте 15 мин при 121 °С.

• Удалите пробирки из автоклава пока агар находится в расплавленном состоянии, поместите пробирки на наклонную поверхность для образования скошенной поверхности и позвольте агару застыть.

• Внесите 0,1 мл приготовленного исследуемого образца.

• Внесите пробирки с исследуемым образцом в измерительные ячейки анализаторе "РЭБИТ". Установите следующие параметры для системы "РЭБИТ":

Продолжительность исследования	48 ч
Температура	30 °С
Критерий детекции	— 10 uS
Интервал	6 мин

• При необходимости время исследования может быть увеличено до 96 ч с интервалом 12 мин для определения некоторых медленно растущих штаммов плесеней.

4.5.4. Определение колиформных бактерий и Escherichia coli на среде COL-ECO Test Broth

Введение

COL-ECO Test Broth позволяет одновременно определять колиформные бактерии и E. coli на системе "РЭБИТ". Автоматическое количественное определение концентрации колиформных бактерий достигается путем построения калибровочного файла при сопоставлении результатов, полученных на анализаторе "РЭБИТ", с данными классического метода, полученных на VRBA агаре или среде Эндо (либо на других коммерческих средах для определения колиформных бактерий). Определение E. coli возможно лишь качественно (присутствие/ отсутствие).

Поскольку состав среды COL-ECO Test Broth отличен от ранее используемых питательных сред, для получения хороших результатов необходимо, чтобы процедура исследования соответствовала протоколу, описанному ниже.

Приготовление

• COL-ECO Test Broth готовится из дегидратированного сухого порошка в концентрации 16.1 г/л. Растворите необходимое количество порошка в соответствующем количестве деионизованной воды.

• Доведите до кипения, чтобы полностью растворить все компоненты среды. ВАЖНО, ЧТОБЫ СРЕДА ДО РАЗЛИВА ЗАКИПЕЛА.

• Когда среда остынет, разлейте ее во флаконы для автоклавирования. Можно разлить среду непосредственно в пробирки для непрямого метода и закрыть их крышками.

• Проавтоклавируйте среду при 121 °С в течение 15 мин.

• Проавтоклавированная среда может храниться при 4 °С в течение 4 недель.

Процедура исследования

• Приготовьте 10-кратное разведение исследуемого продукта, используя доступную стерильную разводящую жидкость.

• Добавьте 1 мл приготовленного исследуемого образца в боросиликатную пробирку для непрямого метода с 4 мл стерильной среды COL-ECO Test Broth. Поместите боросиликатную пробирку с образцом в измерительную ячейку с КОН.

• Инкубируйте образец в модуле анализатора "РЭБИТ", установив следующие параметры:

Продолжительность исследования	24 ч
Температура	37 °С
Критерий детекции	— 10 uS
Интервал	6 мин

• Время Определения, показываемое прибором, может быть откалибровано при сравнении результатов с классическим методом. При наличии калибровочного файла результаты определения будут представлены в виде числа КОЕ (колониеобразующих единиц).

• Продукция кислоты микроорганизмами в исследуемом образце подтверждается изменением цвета среды с красного на желтый.

• Присутствие/отсутствие E. coli в образце после окончания исследования определяется следующим образом:

(а) удалите резиновую пробку и удалите пробирку с образцом из измерительной ячейки (можно перелить содержимое в пластиковую транспортную пробирку);

(б) в темной комнате поместите исследуемый образец под УФЛ с длиной волны 360 нм.

• Присутствие E. coli в образце будет обнаружено по появлению сильного флуоресцентного свечения питательной среды.

Интерпретация полученного результата значительно упрощается в случае использования положительного и отрицательного контролей.

5. Инструкция по приготовлению питательных сред для работы на бактериологическом экспресс-анализаторе "РЭБИТ"

Whitlev Impedance Broth – среда для определения МАФАМ.

Возьмите навеску – 30 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 1 литре дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Разлейте по флаконам и стерилизуйте автоклавированием в течение 15 мин при 121оС.

Whitlev Anaerobe Broth – среда для определения анаэробных бактерий. Возьмите навеску – 29,7 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 1 литре дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Оставьте на 10 минут при комнатной температуре. Доведите среду до кипения и, пока среда горячая, разлейте по флаконам и стерилизуйте автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.

Для увеличения селективности питательной среды для определения облигатных анаэробов внесите в среду раствор неомицина из расчета 75 мг/л.

Buffered Peptone Water – среда для обогащения сальмонелл.

Возьмите навеску – 20,2 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 1 литре дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Разлейте по флаконам и стерилизуйте автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.

Wort Broth – среда для определения дрожжей и плесеней.

Возьмите навеску – 33,3 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 1 литре дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Разлейте по флаконам и стерилизуйте автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.

В приготовленную питательную среду добавьте хлорамфеникол из расчета – 1 флакон на 500 мл среды. Предварительно растворите хлорамфеникол в 4 —5 мл стерильной дистиллированной воды.

MacConkev Broth – среда для определения колиформных бактерий (прямой метод).

Возьмите навеску – 35 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 1 литре дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Разлейте по флаконам и стерилизуйте автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.

Maximum Recovery Diluent – среда для максимального восстановления бактерий – используется для разведения продуктов.

Возьмите навеску – 9,5 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 1 литре дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Разлейте по флаконам и стерилизуйте автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.

COL-ECO Broth – среда для определения колиформных бактерий и одновременного определения в их составе E. coli (непрямой метод).

Возьмите навеску – 16,1 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 1 литре дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Доведите до кипения до полного растворения компонентов. Разлейте по флаконам и стерилизуйте автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.

Easter and Gibson salmonella medium LAB 137 – среда для определения сальмонелл (прямой метод).

Возьмите навеску – 2,5 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 100 мл дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Добавьте 1 флакон X137 (или ТМАО – 0,56 г). Смешайте, доведите до кипения. Когда среда остынет – добавьте 1 мл концентрированного раствора L-цистина. Разлейте по стерильным флаконам или пробиркам.

** Приготовление концентрированного раствора L-цистина.*

Возьмите навеску 0,1 г l-цистина, добавьте 15 мл 1М раствора NaOH и 85 мл деионизованной воды. Стерилизуйте фильтрацией с использованием мембранных фильтров с размером пор 0,2 мкм.

Не автоклавировать!

Bromocresol-purple Azide Broth – среда для определения энтерококков (непрямой метод).

Возьмите навеску – 36 г сухой гомогенной питательной среды из упаковки и растворите в 1 литре дистиллированной (лучше – деионизованной) воды. Добавьте 5 мл глицерина. Разлейте по флаконам и стерилизуйте автоклавированием в течение 15 мин при 115 °С.

Методика приготовления среды Whitley GN2 Broth

Навеску в 12,5 г порошка растворите в 1 литре деионизованной воды, перемешайте.

Разлейте во флаконы и стерилизуйте автоклавированием при 121 °С в течение 15 мин.

6. Приложение

6.1. Поддержание и обработка измерительных ячеек

- После окончания измерения на анализаторе "РЭБИТ" удалите измерительные ячейки из модуля и поместите в транспортные штативы для автоклавирования.
- ТОЛЬКО ЯЧЕЙКИ ДЛЯ НЕПРЯМОГО МЕТОДА: Удалите пробки из ячеек и поместите их в отдельный контейнер для автоклавирования.
- Автоклавируйте ячейки и пробки при 121 °С в течение 15 мин. Не превышайте указанное время и температуру, т. к. это может привести к повреждению ячеек.
- ТОЛЬКО ЯЧЕЙКИ ДЛЯ НЕПРЯМОГО МЕТОДА: Удалите ячейки из автоклава пока агар все еще расплавлен. Удалите стеклянные пробирки из измерительных ячеек и удалите агар под проточной водой. Обычно не требуется разбора измерительных ячеек. Удалите содержимое из стеклянных пробирок. Промойте их под водопроводной водой.
- ТОЛЬКО ЯЧЕЙКИ ДЛЯ ПРЯМОГО МЕТОДА: Удалите содержимое из проавтоклавированных ячеек и разберите ее на отдельные компоненты (электродная часть, пробирка и крышка). Данная процедура должна проделываться всякий раз, когда используемые ячейки сильно загрязнены остатками питательной среды или образца. В случае легкого загрязнения полный демонтаж ячейки должен проводиться ежемесячно.
- Поместите ячейки или компоненты ячеек в горячий 2 %-ный раствор Labdet, приблизительно на 2 часа, затем щеткой ("ершом") тщательно промойте для удаления налетов среды и исследуемого продукта. Альтернативно можно использовать для промывки ячеек ультразвуковую баню с использованием промывочного раствора. Отмывка проводится в течение 40 мин.
- Промойте ячейки и их компоненты в горячей чистой воде для удаления остатков детергента.
- Соберите демонтированные ячейки, используя аппарат для сбора ячейки.
- Если ячейки планируется использовать в непрямом методе, то последующего этапа стерилизации не требуется.
- Чистые ячейки, которые планируется использовать в прямом методе, стерилизуют автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.
- Для того чтобы высушить ячейки, их помещают в термостат при 40 °С на ночь.

- После приблизительно 5 циклов промывки ячеек наружные части электродов необходимо зачистить абразивной губкой для улучшения электрического контакта.

6.2. Приготовление измерительных ячеек для непрямого метода

Общие положения

Приготовление измерительных ячеек для непрямого метода достаточно просто и позволяет проводить определение большинства микроорганизмов с высокой чувствительностью. Тщательность приготовления измерительных ячеек для непрямого метода обеспечивает максимальный срок их хранения и высокую чувствительность.

Методика исследования

- Взвесьте 0,35 г КОН и растворите в 50 мл деионизованной воды. Не нагревайте.
- Взвесьте 1 г Бактериологического агара №1 и растворите в 50 мл деионизованной воды в 100 мл закрывающемся флаконе.
- Полностью растворите агар либо доведя до его кипения, либо автоклавированием.
- До тех пор, пока агар все еще *горячий, но не кипящий*, добавьте холодный раствор КОН и тщательно перемешайте.
- Используя доступные разливочные средства (пипетки), добавьте 0,7 мл смеси агара с КОН на дно чистой, сухой измерительной ячейки анализатора "РЭБИТ".
- Позвольте агару остыть и затвердеть в течение 1 ч, затем тщательно закройте, насколько это возможно, резиновыми пробками для непрямого метода.
- После того как агар застыл, ячейки для непрямого метода должны быть оставлены на 2—3 ч до использования.
- Приготовленные ячейки для непрямого метода могут храниться при комнатной температуре в течение 1 месяца, если они тщательно закрыты и защищены от прямого сильного света. **Не замораживать!**
- Для проверки пригодности партии измерительных ячеек для непрямого метода, поместите несколько ячеек в модуль анализаторе "РЭБИТ", позвольте нагреться в течение 20 мин и проверьте значения проводимости, используя функции "Инженерного экрана". Эти значения при 30 °С должны быть в диапазоне 7 000—10 000 uS. Нельзя использовать ячейки с проводимостью ниже 6 000 uS при 30 °С. Если проводимость ниже 6000 uS, увеличьте концентрацию КОН до 0,5 – 1%.

gost.e-ecolog.ru