Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация контроля и методы выявления бактерий Listeria monocytogenes в пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.2.1122—02

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 2002

gost.e-ecolog.ru

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация контроля и методы выявления бактерий Listeria monocytogenes в пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.2.1122—02

ББК 51.23
О64

О64 **Организация** контроля и методы выявления бактерий Listeria monocytogenes в пищевых продуктах: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002.—31 с.

ISBN 5—7508—0368—6

1. Разработаны: Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Л. Г. Подунова, Э. Ф. Опочинский, Н. С. Кривопалова), ГУ Научно-исследовательским институтом питания Российской Академии медицинских наук (В. А. Тутельян, С. А. Шевелева, И. Б. Куваева, Н. Р. Ефимочкина), Департаментом госсанэпиднадзора Минздрава России (Н. Н. Иванова), Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН (И. С. Тартаковский, С. А. Ермолаева, Т. С. Карпова), Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии МЗ РФ (Б. Л. Черкасский), Центром госсанэпиднадзора в г. Москве (Н. Я. Салова, В. П. Голованова), Центром госсанэпиднадзора в Тульской области (Т. А. Попова), Всероссийским научно-исследовательским институтом мясной промышленности (Ю. Г. Костенко), Координационным микробиологическим центром рыбной промышленности ГИПРОРЫБФЛОТа (Л. Б. Мухина, Е. Ю. Дмитриева), Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной вирусологии и микробиологии (В. М. Котляров).

2. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 22.04.02.

3. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 5—7508—0368—6

© Минздрав России, 2002
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002

Содержание

1. Общие положения и область применения 4
2. Сущность метода 7
3. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды 8
3.1. Аппаратура и инструментарий 8
3.2. Лабораторная посуда и материалы 9
3.3. Реактивы и питательные среды 9
4. Подготовка к анализу 12
4.1. Приготовление растворов и реактивов 12
4.2. Приготовление питательных сред 13
5. Отбор и подготовка проб пищевых продуктов для анализа 16
5.1. Общие положения по отбору и подготовке проб 16
5.2. Отбор и подготовка проб молока, молочных продуктов, сыров, мороженого 17
5.3. Отбор и подготовка проб мяса, мясных полуфабрикатов, мяса птицы и птицепродуктов, колбасных изделий и других мясопродуктов 17
5.4. Отбор и подготовка проб плодоовощной продукции 17
5.5. Отбор и подготовка проб рыбы, нерыбных объектов промысла и продуктов, вырабатываемых из них 18
5.6. Продукты детского, лечебного питания и их компоненты 18
6. Проведение анализа 19
7. Проведение исследования с использованием кондуктометрического анализатора «Бак Трак» 24
7.1. Предварительное обогащение – 1 этап 24
7.2. Обогащение – 2 этап 24
8. Выявление Listeria monocytogenes в реакции нарастания титра фага (РНФ) 25
9. Биологические исследования 28
10. Требования безопасности 28
Библиографические список 29

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации - Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
22 апреля 2002 г.
МУК 4.2.1122—02
Дата введения: 1 июня 2002 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация контроля и методы выявления бактерий Listeria monocytogenes в пищевых продуктах

Методические указания

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают основные принципы организации контроля и методику проведения лабораторных исследований пищевых продуктов по выявлению в них бактерий Listeria monocytogenes.

При контроле пищевых продуктов на загрязненность патогенными микроорганизмами в СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» предусматривается новый микробиологический показатель «Listeria monocytogenes – не допускаются» в 25 г продуктов массового назначения и в 50—100 г для продуктов детского и специализированого питания.

Проведение контроля на Listeria monocytogenes позволит получить реальную картину ситуации в Российской Федерации, оценить степень загрязненности пищевой продукции и дать оценку эффективности принимаемых мер в целях обеспечения ее безопасности в плане новых и вновь возникающих возбудителей инфекций с пищевым путем передачи для здоровья и жизни человека.

1.2. Методические указания предназначены для применения в лабораториях учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, осуществляющих контроль за качеством продовольственного сырья и пищевых продуктов, в т. ч. импортируемых в Российскую Федерацию, гигиеническую оценку и выдачу санитарно-эпидемиологических заключений, а также бактериологическую диагностику заболеваний с пищевым путем передачи; в лабораториях других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения контроля безопасности пищевой продукции и продовольственного сырья; в организациях, независимо от форм собственности, осуществляющих производственный контроль продовольственного сырья и пищевых продуктов в процессе промышленного производства и выпуска продукции.

1.3. Методические указания являются обязательными при контроле пищевых продуктов в ходе проведения противоэпидемических мероприятий при возникновении вспышек, а также в порядке осуществления санитарно-эпидемиологического надзора.

1.4. Организация проведения контроля пищевых продуктов на Listeria monocytogenes.

Лабораторный контроль за отсутствием Listeria monocytogenes в пищевых продуктах, где нормируется этот показатель, проводится:

- в порядке надзора за соблюдением установленных требований в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов в ходе проверок изготовления и оборота пищевой продукции, оказания услуг в сфере торговли и общественного питания;
- при экспертизе продукции и подтверждении соответствия требованиям нормативных документов для целей гигиенической оценки и выдачи санитарно-эпидемиологических заключений;
- при контроле за безопасностью продукции изготовителем (производственный контроль);
- в ходе проведения противоэпидемических мероприятий и при эпидрасследовании заболеваний.

1.5. При проведении контроля безопасности по показателю Listeria monocytogenes согласно Положению о государственной санитарно-эпидемиологической службе, утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554, должен осуществляться периодический отбор образцов пищевой продукции.

1.5.1. Порядок контроля и кратность исследований должны устанавливаться в соответствии с методическими и инструктивными документами, утвержденными или согласованными в установленном порядке органами государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, при этом необходимо учитывать специфику производства, степень его эпидзначимости, материально-техническое оснащение и т. п.

Особого внимания должны заслуживать предприятия, вырабатывающие продукты детского питания, детские молочные кухни, пищеблоки детских лечебно-профилактических учреждений, стационаров для онкологических, гематологических больных, домов ребенка, родильных домов, домов престарелых и инвалидов и т. п.

При проведении текущего надзора рекомендуемая минимальная периодичность выборочного лабораторного контроля пищевой продукции массового потребления – 1 раз в квартал; для детского и диетического питания – 2 раза.

1.5.2. При производственном контроле организация и периодичность лабораторных исследованиий продукции по показателю Listeria monocytogenes должна устанавливаться изготовителем продукции в соответствии с действующими санитарными правилами и согласовываться с учреждениями государственной санитарно-эпидемиологической службы по месту расположения предприятия-изготовителя.

1.5.3. Контроль пищевых продуктов по показателю Listeria monocytogenes с целью гигиенической оценки для выдачи санитарно-эпидемиологических заключений и подтверждения соответствия установленным требованиям при проведении экспертизы осуществляется в уполномоченных лабораториях центров госсанэпиднадзора или других организаций, аккредитованных в установленном порядке.

1.6. В пищевых продуктах, предназначенных для непосредственного употребления в пищу, в отношении которых отсутствуют микробиологические нормативы или данные о возможности выделения Listeria monocytogenes, контроль Listeria monocytogenes не проводится, однако в случае заболеваний людей и/или нарушений в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов образцы таких продуктов должны быть направлены на лабораторное исследование.

1.7. Организация лабораторных исследований на Listeria monocytogenes.

Допускается организация лабораторных исследований путем их поэтапного выполнения в лабораториях учреждений госсанэпидслужбы различных уровней. При отсутствии возможности идентификации выделенных культур последние могут быть переданы в лаборатории, располагающие соответствующей материально-технической базой и квалифицированным персоналом, для выдачи окончательного результата.

2. Сущность метода

Методические указания содержат описание метода выявления бактерий Listeria monocytogenes, основанного на высеве определенного количества продукта в жидкие селективные среды, инкубировании посевов, выявлении в этих посевах бактерий, способных расти и образовывать типичные колонии на агаризованных дифференциально-диагностических средах. Принадлежность выделенных культур к Listeria monocytogenes определяется по биохимическим, морфологическим и другим свойствам.

Метод выявления L. monocytogenes в пищевых продуктах основан на применении специальных селективных и дифференциально-диагностических сред. Селективность сред по отношению к сопутствующей микрофлоре обеспечивается включением в их состав хлорида лития, акрифлавина, циклогексимида, налидиксиновой кислоты, полимиксина или других антибиотиков. Внесение эскулина и цитрата аммония железа позволяет подтверждать наличие листерий по почернению среды за счет гидролиза эскулина в присутствии ионов Fe+. Подтверждающие тесты родовой и видовой идентификации включают окраску по Граму, определение подвижности выделенных на агаризованных средах типичных по физиологическим и морфологическим признакам культур, их способности восстанавливать нитраты до нитритов, сбраживать рамнозу, ксилозу и маннит, способности к гидролизу лецитина на ГРМ-среде с активированным углем, а также определение наличия В-гемолиза на кровяном агаре и дифференциацию L. monocytogenes от других гемолизирующих листерий в CAMP-тесте с контрольными штаммами Staphylococcus aureus и Rhodococcus equi.

При необходимости для выявления L. monocytogenes в пищевых продуктах проводится постановка реакции нарастания титра фага (РНФ).

Предлагаемый метод обнаружения L. monocytogenes, гармонизированный с Международным стандартом ISO 11290—111996, предусматривает определение наличия или отсутствия L. monocytogenes

в нормируемой массе продукта в соответствии с нормативами СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», выраженными в альтернативной форме и основанными на существующей системе отбора образцов и оценки результатов анализа по двухклассной системе.

Методические указания также содержат описание методики кондуктометрического определения L. monocytogenes в пищевых продуктах с использованием микробиологического анализатора «Бак Трак». Метод кондуктометрического анализа основан на регистрации изменений импеданса – сопротивления питательной среды, которые происходят в процессе роста и метаболической активности микроорганизмов.

3. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды

3.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64—1—28—70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64—1—1382—72
Баня водяная с подогревом	ГОСТ 12026—76
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБР-1, МБР-3, МБС	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89 Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с	ГОСТ 6709—72
Гомогенизатор перистальтического типа «Стомайкер» или других наименований	
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ 16—535—84
Холодильник бытовой электрический	

Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Штативы для пробирок	
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145—84
Электроплитка	ГОСТ 14919—83

3.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Бутылки стеклянные для химических реактивов	
Кастрюли эмалированные	ГОСТ 24778—81
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см^3	ГОСТ 29227—91
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки Уленгута (поплавки)	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932—90
Ступка фарфоровая с пестиком	ГОСТ 9147—80
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С (цена деления шкалы 1 °С)	ГОСТ 13646—68
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90

3.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ), фирма-изготовитель

3.3.1. Реактивы, компоненты сред

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
D-глюкоза, ч.	ГОСТ 6038—79
D-лактоза, 1-водная	ТУ 6—09—22—98—79
Маннит	
Ксилоза	
Рамноза	

Калия гидроокись	ГОСТ 24363—80
Калий фосфорнокислый однозамещенный, ч.	ГОСТ 4198—75
Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, х. ч.	ГОСТ 3118—77
Литий хлористый, ч. или х. ч., или ч. д. а.	ГОСТ 4328—77
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 31739—78
Набор реактивов для окраски по Граму	
Натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный, 4-водный, ч. или х. ч.	ГОСТ 4170—78
Натрия гидроокись, ч. д. а.	ГОСТ 4328—77
Натрий лимоннокислый, 5,5-водный, ч. д. а.	ГОСТ 22280—75
Натрий хлористый, ч. или х. ч., или ч. д. а.	ГОСТ 4233—77
Пара-диметиламидобензальдегид, ч.	ТУ 6—09—3272—77
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805—76
Полимиксин «М» или «В» сульфат по 500 000 ед. (медпрепарат)	
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Железа аммонийного цитрат	
Феноловый красный	ГОСТ 5853—51
Фенолфталеин	ГОСТ 5850—72
Фуксин основной	ТУ 6—09—4119—75
Хлороформ технический	ГОСТ 2—15—76—72
Уксусная кислота	ГОСТ 61—75
Сульфаниловая кислота	
А-нафтол	
Цинк порошкообразный	ГОСТ 3640
Эскулин	
Экстракт дрожжевой сухой	
Лития хлорид	
Уголь активированный	Р.72.270.3
Желток куриного яйца	
Крахмал	
Налидиксовая кислота	Lab M, HiMedia
Акрифлавина гидрохлорид (трипафлавин)	Lab M, HiMedia
Цефтазидим	
Циклогексимид	

Тест-штаммы Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii, Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Rhodococcus equi, типичные по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам	

3.3.2. Среды питательные

3.3.2.1. Для культивирования изолятов

Триптозный ГРМ-агар и ГРМ-бульон	ФС42—3377—97 (ГНЦ ПМ)
Среда ГРМ № 1	ВФС 42—2988—97 (ГНЦПН)
Питательный бульон и питательный агар	ТУ 10—02—02—789—176—94
Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA)	HiMedia M1214
Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB)	HiMedia M1263

3.3.2.2. Среды селективного обогащения

Бульон Фрейзера (Fraser Broth)	BioMerieux 42046
Бульон Фрейзера половинной концентрации (Half Fraser Broth)	BioMerieux 42048
Fraser Broth Base, Fraser Supplement, Fraser Selective Supplement	HiMedia M1327, FD 141, FE1251
Бульон для обогащения Listeria Enrichment Broth	Merck 1.10549, HiMedia M569
Бульон вторичного обогащения для листерий – Fraser Secondary Enrichment Broth Base	HiMedia Ml 083
Селективный бульон для листерий – Listeria Selective Broth Base	HiMedia M889
Среды Pre-Media 403A и BiMedia 401A, 402A, 403A	Lab M

3.3.2.3. Дифференциально-диагностические селективные среды

PALCAM – Listeria Selective Agar Base с селективной добавкой 1.12122	Merck 1.1 1755
PALCAM-агар – селективная среда для выделения листерий	BioMerieux 43559
Агар для идентификации листерий – Listeria Identification Agar Base (PALCAM)	HiMedia Ml 064

Oxford-агар – селективная среда для выделения листерий	BioMerieux 43 560
Listeria Oxford Medium Base и Oxford Listeria Supplement	HiMedia Ml 145, FD 071
Среды Гисса с маннитом, ксилозой, рамнозой	ФС (ЦНИИВС им. И. И. Мечникова, НИИ питательных сред)
Среда для определения подвижности листерий (Listeria motility medium)	HiMedia M 1215
SIM-агар (сероводород-индол-подвижность)	Difco
Blood Agar Base – основа кровяного агара	HiMedia M073
Тест-системы биохимические для видовой идентификации API Listeria	BioMerieux

Допускается использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29 000. Питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

4. Подготовка к анализу

4.1. Приготовление растворов и реактивов

4.1.1. Пептонно-солевой раствор	По ГОСТ 26669
4.1.2. Изотонический (0,85 %-ный водный) раствор хлорида натрия	По ГОСТ 26669
4.1.3. Растворы и реактивы для постановки реакции нитратредукции	По ГОСТ 10444.8—99
4.1.4. Приготовление растворов и реактивов для окраски препаратов по Граму	По ГОСТ 10444.1 или в соответствии с инструкцией по применению
4.1.5. Раствор перекиси водорода для определения каталазы 3 %-ный	По ГОСТ 30425

4.2. Приготовление питательных сред

Среды промышленного изготовления, поименованные в п. 3.3.2, готовятся согласно прописям на этикетке или в соответствии с рекомендациями фирмы.

Допускается применение сред лабораторного приготовления по п.п. 4.2.1—4.2.10.

Приготовление питательных сред Pre-Media 403A и BiMedia 401A, 402A, 403A для определения листерий проводят в соответствии с МУК 4.2.590—96 «Бактериологические исследования с использованием микробиологического экспресс-анализатора «Бак Трак 4100».

4.2.1. Питательный агар с 1 % глюкозы и питательный бульон с 1 % глюкозы (МПА с 1 % глюкозы, МПБ с 1 % глюкозы) готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1.

4.2.2. *Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) / Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA).*

Состав среды (г/л): ферментативный гидролизат казеина – 17,0; пептон соевый –3,0; натрий хлористый – 5,0; фосфат калия однозамещенный – 2,5; глюкоза – 2,5; дрожжевой экстракт – 6,0; агар микробиологический (для TSYEA) – 15,0.

Компоненты растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,3 ± 0,2 и автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин.

4.2.3. *Среды селективного обогащения типа бульона Фрейзера.*

Приготовление основы среды (г/л) : ферментативный гидролизат казеина – 5,0; пептон – 5,0; мясной экстракт – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0; натрий хлористый – 20,0; калия дигидрофосфат – 1,35; натрия гидрофосфат – 12,0; эскулин – 1,0; литий хлористый – 3,0; железа аммонийного цитрат – 0,25 – растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,2 ± 0,2 и автоклавируют при 121 °С 15 мин.

Перед употреблением в основу среды вносят асептически раствор селективных компонентов следующего состава:

4.2.3.1. Для приготовления среды типа бульона Фрейзера первичного обогащения*: налидиксовой кислоты – 10 мг, акрифлавина гидрохлорид – 12,5 мг растворить в 10 см^3 стерильного 0,2 N гидроксида натрия.

---

* Допускается при приготовлении среды типа бульона Фрейзера первичного обогащения готовить основу среды без добавления эскулина и цитрата железа аммонийного.

4.2.3.2. Для приготовления среды типа бульона Фрейзера вторичного обогащения: налидиксовой кислоты – 20 мг, акрифлавина гидрохлорид – 25 мг растворить в 10 см^3 стерильного 0,2 N гидроксида натрия.

Готовые среды разливают в стерильные колбы или пробирки и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С.

4.2.4. *PALCAM-агар (полимиксин-акрифлавин-литий хлорид-цефтазидим-эскулин-маннитол – агар)* – селективная дифференциально-диагностическая среда для выделения листерий.

Приготовление основы среды (г/л): пептон мясной ферментативный – 23,0; дрожжевой экстракт – 3,0; крахмал – 1,0; натрия хлорид – 5,0; эскулин – 0,8; лития хлорид – 15,0; железа аммония цитрат – 0,5; глюкоза – 0,5; маннит – 10,0; феноловый красный – 0,08; агар – 15,0 – растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,0 ± 0,2 и автоклавируют при 121 °С 15 мин.

К стерильной расплавленной основе среды добавляют асептически раствор селективных компонентов следующего состава: акрифлавин – 0,005; полимиксин «В» – 100 000 ед.; цефтазидим – 0,02 в 10 см^3 стерильной дистиллированной воды.

Готовую среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С.

4.2.5. *Селективная дифференциально-диагностическая среда для выделения листерий типа Оксфорд-агара.*

Приготовление основы среды (г/л): пептон мясной ферментативный – 23,0; крахмал кукурузный – 1,0; натрия хлорид – 15,0; эскулин – 1,0; лития хлорид – 15,0; железа аммония цитрат – 0,5; глюкоза – 0,5; агар – 15,0 растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,0 ± 0,2 и автоклавируют при 121 °С 15 мин.

К стерильной расплавленной основе среды добавляют асептически раствор селективных компонентов следующего состава: акрифлавина гидрохлорид – 0,005; циклогексимид – 0,4, колистина сульфат* – 0,02, цефатетан* – 0,002, фосфомицин* – 0,01 мг в 10 см^3 50 %-ного этилового спирта.

Готовую среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С.

---

* Допускается замена комплекса перечисленных антибиотиков на полимиксин в количестве 500 000 ед. на 1 л.

4.2.6. *Кровяной агар.*

К растопленному и охлажденному до 45—50 °С питательному агару с 1 % глюкозы (п. 4.2.1) добавляют 5 % по объему дефибринированной крови животных. Разливают в чашки Петри диаметром 90 мм по 15 см^3 среды и подсушивают при 37 °С.

Засев производят в теплые чашки.

4.2.7. *Питательный агар с эритроцитами барана.* Дефибринированную или стабилизированную цитратом кровь барана центрифугируют в асептических условиях 30 мин при 900 об/мин. Надосадочную жидкость сливают. Осадок суспендируют в стерильном физиологическом растворе до первоначального объема, добавляют в количестве 5 % по объему к растопленному и охлажденному до 45—50 °С питательному агару (п. 4.2.1). Разливают в чашки Петри по 10 см^3, подсушивают при 37 °С. Чашки используют для посева теплыми.

4.2.8. *Среда для определения подвижности:* 20 г гидролизата казеина ферментативного, 6 г пептона мясного ферментативного и 5 г агара растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, устанавливают pH 7,3 ± 0,2, разливают в пробирки по 5—7 см^3 и автоклавируют при 121 °С 15мин.

4.2.9. *Среды Гисса по ГОСТ 10444.1 с маннитом, рамнозой, ксилозой.* 10 г пептона ферментативного и 5 г натрия хлористого растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды и добавляют 10 г соответствующего углевода. Устанавливают pH 7,1 ± 0,1, вносят 10 мл индикатора Андреде (также возможно использование индикатора бромкрезолового пурпурного, «ВР» и др.), разливают в пробирки и стерилизуют при 112 °С в течение 20 мин.

4.2.10. *Среда для определения лецитиназной активности листерий.*

К среде ГРМ № 1 перед стерилизацией добавляют активированный уголь, растертый до порошкообразного состояния, до концентрации 0,5 % (вес/объем). Желток куриного яйца разводят в 150 мл физиологического раствора и добавляют 5 % по объему к стерилизованному и охлажденному до 40—50 °С питательному агару. Разливают в чашки Петри по 20 см^3 и подсушивают при 37 °С. Аналогично готовят среду с добавлением желтка, но без добавления активированного угля.

5. Отбор и подготовка проб пищевых продуктов для анализа

5.1. Общие положения по отбору и подготовке проб

Отбор и подготовку проб продукции производят в соответствии с ГОСТ 26668—85 «Методы отбора проб для микробиологических анализов», ГОСТ 26669—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов», МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов», ГОСТ Р 51446 (ИСО 7218—96), а также в соответствии с действующими ГОСТ и НД на конкретные виды продуктов.

Масса или объем отбираемых проб должны быть достаточными для проведения исследования и минимально вдвое превышать аналитический образец. Из точечных проб составляют навеску массой 25 ± 0,1 г (50—100 г – для продуктов детского, лечебного и специализированного питания).

От продукции в потребительской таре в мелкой фасовке пробы отбирают в количестве одной или нескольких единиц в зависимости от массы или объема потребительской тары, с тем чтобы количество было достаточным для проведения анализа.

От продукции в транспортной или потребительской таре больших размеров или неупакованной пробы отбирают из разных мест с различной глубины, включая поверхность.

Для микробиологических анализов пробы отбирают до взятия проб на физико-химические и органолептические анализы стерильным инструментом в стерильную посуду. При этом от образца отбирают несколько точечных проб из разных мест, которые измельчают и перемешивают, из них составляют навеску 25 г.

Замороженные продукты предварительно размораживают до температуры внутри продукта 0—(–1) °С; продукты, содержащие жиры (сливочное масло, мороженое) нагревают до температуры 40—45 °С и перемешивают.

Отобранные образцы перемешивают и измельчают или доводят до однородной консистенции по ГОСТ 26669, из измельченной суспензии составляют навеску необходимой массы.

При посевах высококислотных или щелочных (с pH < 6 или >7,5) жидких и твердых продуктов для предотвращения снижения pH питательных сред на 0,5 и более, pH продукта перед посевом доводят до (7,0 ± 0,2) по ГОСТ Р 50480.

5.2. Отбор и подготовка проб молока, молочных продуктов, сыров, мороженого

Отбор и подготовку проб продуктов проводят согласно ГОСТ 3622—68 «Молоко и молочные продукты. Отбор и подготовка их к испытанию» и 9225—84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа».

Кисломолочные продукты, сыр, творог, творожные изделия и пастообразные продукты тщательно измельчают с помощью гомогенизаторов перистальтического типа или ножевых и подвергают нейтрализации, масло сливочное и мороженое растапливают до сметанообразной консистенции.

5.3. Отбор и подготовка проб мяса, мясных полуфабрикатов, мяса птицы и птицепродуктов, колбасных изделий и других мясопродуктов

Отбор и подготовку проб мяса, субпродуктов, мясных полуфабрикатов, колбасных изделий и других мясных продуктов проводят по ГОСТ 21237 «Мясо. Методы бактериологического анализа», ГОСТ 4288 «Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленного мяса», ГОСТ 9958, ГОСТ 9792 «Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц».

Массу навески отбирают в соответствии с п. 6.1.

Отбор и подготовку проб мяса птицы, субпродуктов и птичьих полуфабрикатов проводят по ГОСТ Р 50396.0 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям».

5.4. Отбор и подготовка проб плодоовощной продукции

Отбор и подготовку к анализу проб плодоовощной продукции проводят согласно ГОСТ 26668, ГОСТ 26669, ГОСТ 26313 «Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб», кроме подготовки к анализу проб поверхностно контаминированных и пюреобразных продуктов. Для поверхностно-контаминированной и быстрозамороженной плодоовощной продукции подготовку проводят согласно «Инструкции по микробиологическому контролю быстрозамороженной плодоовощной продукции» (МЗ СССР 29.09.89, прил.1, п. 1.3). Для анализа поверхностно-контаминированной продукции готовят суспензию добавлением к навеске массой (100 ± 30) г, отобранной из трех единиц тары

или фасовки, 0,1 %-ного пептонно-солевого раствора в количестве, равном массе навески. При этом 1 см^3 полученной суспензии оценивают как 1 г (см^3) продукта.

Из измельченных плодов, овощей, полуфабрикатов и пюреобразных и жидких отбирают раздельно навески массой по (100 ± 30) г из трех единиц тары или фасовки и готовят объединенную пробу массой в соответствии с п. 6.1.

5.5. Отбор и подготовка проб рыбы, нерыбных объектов промысла и продуктов, вырабатываемых из них

Отбор и подготовку проб проводят согласно «Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных» № 5319—91 от 22.02.91 и ГОСТ 7631—85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний».

Отбор проб свежей, охлажденной и мороженой рыбы проводят от 2 точечных образцов, мышечная ткань в которых составляет не менее 25 г по ГОСТ 7631—85. Из каждой точечной пробы стерильным инструментом вырезают спинные мышцы с кожей, перемешивают и отвешивают 25 г, затем измельчают с помощью гомогенизаторов перистальтического типа или ножевых и гомогенизируют в 225 см^3 среды накопления.

5.6. Продукты детского, лечебного питания и их компоненты

Отбор и подготовку проб продуктов детского, лечебного питания и их компонентов проводят согласно МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов».

Отобранные пробы продуктов перед исследованием тщательно перемешивают, кисломолочные продукты нейтрализуют (на 10 см^3/г исследуемого продукта или его первого разведения для сухих кисломолочных продуктов, напитка или закваски добавляют 1,0 см^3 стерильного раствора двууглекислого натрия с массовой концентрацией 100 г/см^3). Сыр, творог, творожные изделия и пастообразные продукты тщательно измельчают и нейтрализуют. Топленое масло или молочный жир расплавляют при температуре 40—45 °С и перемешивают до получения однородной эмульсии.

6. Проведение анализа

6.1. Подготовленную в соответствии с п. 5. навеску исследуемого продукта (гомогената, смыва с поверхности) в количестве 25 г ($см^3$) вносят в одну из сред для первичного обогащения в количестве 225 $см^3$ (по п.п. 3.3.2.2, 4.2.3.1). При необходимости анализа других масс продукта их посев проводят в среду также в соотношении 1 : 9 по объему.

Посевы термостатируют при 37 °С в течение (24 ± 2) ч. При росте листерий на средах предобогащения, содержащих эскулин и цитрат железа аммонийного, наблюдается почернение среды за счет гидролиза гликозида эскулина до глюкозы и эскулетина. Эскулетин реагирует с ионами железа, образуя комплекс черного или оливкового цвета. На других средах почернения не отмечается.

6.2. После термостатирования продукта в среде для первичного обогащения 0,1 $см^3$ суспензии пересевают в 10 $см^3$ одной из жидких сред для вторичного обогащения по п.п. 3.3.2.2, 4.2.3.2. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. В средах с эскулином отмечают почернение как признак возможного присутствия бактерий рода Listeria.

6.3. Из пробирок после термостатирования, независимо от наличия или отсутствия признаков роста, и в т. ч. почернения, делают пересев по 0,1 $см^3$ на поверхность двух чашек Петри с одной из агаризованных дифференциально-диагностических сред по п.п. 3.3.2.3, 4.2.4, 4.2.5. Посевной материал растирают стерильным шпателем. Допускается проводить пересев петлей штрихом. Чашки со средами предварительно подсушивают.

Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

6.4. Проведение анализа без этапа вторичного обогащения. При посеве продуктов с низким исходным уровнем микробной контаминации и при отсутствии признаков роста в жидкой среде (помутнение, почернение и др.) допускается проводить пересев на чашки с агаризованными дифференциально-диагностическими средами сразу после этапа первичного обогащения по п. 6.2.

6.5. При отсутствии роста на чашках с дифференциально-дианостическими средами типа Оксфордского агара и PALCAM-агара анализ прекращают и дают заключение об отсутствии L. monocytogenes в исследованной пробе продукта.

6.6. При обнаружении характерного роста на чашках отбирают 3—5 колоний для их дальнейшего изучения.

На средах типа PALCAM-агара через 24 ч инкубирования листерии формируют мелкие, серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом, диаметром 0,5—1,0 мм, иногда с черным центром. Через 48 ч колонии диаметром 1,0—2,0 мм приобретают зеленую окраску с углубленными центрами, окруженными черным ореолом. Кокковая микрофлора (бактерии родов Staphylococcus, Enterococcus) образует желтые колонии за счет ферментации маннита.

На Оксфордском агаре (Oxford agar) листерии, выращенные в течение 24 ч, мелкие (1 мм), сероватые, окруженные черным ореолом. Через 48 ч – более темные, около 2 мм в диаметре, с черным ореолом и углубленным центром.

При появлении сплошного роста листерий производят пересев бактериологической петлей из зон наибольшего почернения среды штрихами на 2—3 чашки Петри с селективной дифференциально-диагностической питательной средой (Оксфордский или PALKAM-агар) для получения изолированных колоний. Посевы термостатируют аналогично п. 6.3.

6.7. Отобранные характерные колонии, подозрительные на принадлежность к Listeria monocytogenes, пересевают на среды: МПА с 1 % глюкозы (п. 4.2.1), триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) по п. 3.3.2.1 или 4.2.2 для получения изолированных колоний, которые подвергают дальнейшему изучению.

Посевы термостатируют при температуре 30 °С в течение 24 ч.

6.8. Идентификация выделенных культур. Для определения принадлежности выделенных микроорганизмов к роду Listeria полученные на средах культивирования чистые культуры микроскопируют по Граму, определяют наличие у них каталазы, подвижность при двух температурах инкубирования – 22 и 37 °С, способность к ферментации маннита и ставят реакцию нитрат-редукции.

6.8.1. Окраска по Граму. Бактерии рода Listeria являются грамположительными тонкими короткими палочками, спор не образуют.

6.8.2. Каталазную активность культур определяют в соответствии с ГОСТ 30425 по способности каталазы разлагать перекись водорода с выделением пузырьков газа. Реакцию ставят с охлажденной до комнатной температуры суточной культурой на стерильном предметном стекле. Изолированную колонию, взятую с поверхности питательной среды, растирают на стекле и пипеткой наносят каплю 3 %-ного раствора перекиси водорода. Если через 30—60 с на стекле

появляются пузырьки газа, то считают результаты реакции положительными. Параллельно ставят контрольную пробу.

Бактерии рода Listeria являются каталазоположительными.

6.8.3. Подвижность культур определяют посевом уколом в среды по п. 3.3.2.3 и 4.2.8 и инкубированием при двух температурах – 25 и 37 °С в течение 48—72 ч.

Бактерии рода Listeria подвижны при 20—25 °С (образуют характерный рост вокруг линии укола, похожий на зонтик) и неподвижны (или слабоподвижны) при 35—37 °С.

6.8.4. Для определения способности сбраживать углеводы культуры пересевают на пестрый ряд в среды Гисса по п.п. 3.3.2.3 или 4.2.9. Посевы термостатируют 7 дней при 37 °С, наличие ферментативной активности в отношении углеводов определяют по изменению окраски сред за счет образования кислоты.

Большинство бактерий рода Listeria не утилизируют маннит (за *исключением L. grayi и L. grayi subsp. murrayi).*

6.8.5. Постановку реакции нитрат-редукции проводят по ГОСТ 10444.8—88. Бактерии рода Listeria не восстанавливают нитраты до нитритов (за исключением L. grayi и L. grayi subsp. murrayi).

Обнаружение в посевах грамположительных коротких тонких палочек, каталазоположительных, не восстанавливающих нитраты до нитритов, не утилизирующих маннит, подвижных при 25 °С и неподвижных при 37 °С, указывает на принадлежность выделенных на дифференциально-диагностических средах культур с характерной морфологией к роду Listeria.

Для подтверждения принадлежности выделенных листерий к виду L. monocytogenes определяют способность к ферментации рамнозы, ксилозы, наличие лецитиназной и бета-гемолитической активности и проводят постановку КАМП-теста (CAMP-test). Дифференцирующие признаки видов рода Listeria указаны в табл. 1.

Для видовой дифференциации выделенных культур листерий допускается использовать биохимические тест-системы API Listeria фирмы «BioMerieux». При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

Таблица 1

Признак	L. monocytogenes	L. ivanovii	L. seeligeri	L. innocua	L. grayi	L. welshimeri
Ферментация: • маннита	–	–	–		+	–
• ксилозы	–	+	+	–		+
• рамнозы	+	–	–	+/–	+/–	+/–
Бета-гемолиз	+	+	+	–	–	–
КАМП-тест (CAMP-test). Усиление гемолиза около штриха: • Rhodococcus equi	–	+	–	–	–	–
• Staphylococcus aureus	+	–	+	–	–	–
Лецитиназная активность: • на среде с активированным углем	+	+	–	–	–	–
• на среде без угля	–	+	–	–	–	–

6.8.6. Наличие способности ферментировать рамнозу и ксилозу – определяют аналогично п. 6.8.4. Бактерии L. monocytogenes утилизируют рамнозу с образованием кислоты и не утилизируют ксилозу.

6.8.7. Бета-гемолитическую активность исследуемых культур определяют по образованию зон просветления за счет растворения эритроцитов вокруг колоний при посеве на поверхность кровяного агара, приготовленного с добавлением стерильной дефибринированной крови барана или кролика. Посевы на кровяном агаре (п.п. 3.3.2.3, 4.2.6) термостатируют при 37 °С в течение 24 ч.

Listeria monocytogenes обладают β-гемолитической активностью (образуют узкие четкие зоны просветления вокруг колоний).

6.8.8. Постановку КАМП-теста проводят для дифференциации L. monocytogenes от других видов листерий, обладающих гемолитической активностью.

Для проведения теста 2—3-суточные культуры гемолитических штаммов Staphylococcus aureus и Rhodococcus equi засевают на кровяной агар с эритроцитами барана двумя параллельными штрихами на расстоянии 5,0—5,5 см, как показано на рис. 1.

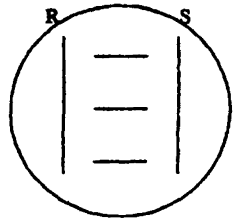


Рис. 1.
S – посев Staphylococcus aureus; R – посев Rhodococcus equi.

Между вертикальными штрихами St. aureus и Rh. equi засевают параллельными штрихами исследуемые культуры листерий на расстоянии друг от друга не менее 1 см и от вертикальных штрихов – 0,5 см. В качестве контрольных используют тест-штаммы L. monocytogenes и L. ivanovii. Инкубацию проводят 24 ч при 37 °С. Отмечают форму и размеры зон гемолиза около вертикальных штрихов роста стафилококка и родококка.

Listeria monocytogenes дает расширение зоны гемолиза около штриха St. aureus (положительный КАМП-тест) и имеет отсутствие изменений зоны гемолиза рядом со штрихом Rh. equi (отрицательный КАМП-тест).

6.8.9. Для определения лецитиназной активности дно двух чашек Петри со средой ГРМ № 1, содержащих: 1 чашка – желток куриного яйца и активированный уголь, 2 чашка – желток куриного яйца без активированного угля – делят на несколько секторов или квадратов, исследуемые культуры и контрольные штаммы листерий пересевают параллельно короткими штрихами на соответствующие секторы чашек, содержащих и не содержащих уголь. Инкубируют 48 ч при 37 °С. Чашки просматривают в проходящем свете и определяют наличие активности в присутствии и в отсутствии активированного угля, сравнивая с контрольными высевами музейных штаммов. Listeria ivanovii дает плотную зону помутнения шириной 3—6 мм независимо от присутствия активированного угля. Listeria monocytogenes дает аналогичную зону помутнения в присутствии активированного угля и не дает при отсутствии угля. Другие виды листерий не дают зоны помутнения.

6.9. Учет результатов. Результат оценивают по каждой исследованной пробе отдельно. В образце продукта констатируют присутствие Listeria monocytogenes, если при посеве на селективные среды выделены короткие неспорообразующие грамположительные па-

лочки, каталазоположительные, подвижные при 25 °С и неподвижные при 37 °С, утилизирующие эскулин, сбраживающие с образованием кислоты рамнозу и не сбраживающие маннит и ксилозу, не восстанавливающие нитраты до нитритов, обладающие бета-гемолитической активностью, дающие положительную реакцию в КАМП-тесте со Staphylococcus aureus и отрицательную – с Rhodococcus equi, проявляющие лецитиназную активность на среде ГРМ № 1 с добавлением желтка куриного яйца и в присутствии активированного угля.

Результаты выявления Listeria monocytogenes в определенной навеске продукта записывают: «Listeria monocytogenes обнаружены в 25 г (см^3) (в 50—100 г – для продуктов детского, лечебного и специализированного питания) продукта» или «Listeria monocytogenes не обнаружены в 25 г (см^3) (в 50—100 г – для продуктов детского, лечебного и специального питания) продукта».

Результат оценивают по каждой пробе отдельно.

7. Проведение исследования с использованием кондуктометрического анализатора «Бак Трак»

7.1. Предварительное обогащение – 1 этап

Для предварительного обогащения используется среда Pre-Media 403A.

Необходимое количество продукта, в котором регламентируется отсутствие L. monocytogenes, смешивают со средой Pre-Media 403A в соотношении 1/10, затем образец гомогенизируют и инкубируют в течение 24 ч.

7.2. Обогащение – 2 этап

Для обогащения используют одну из сред BiMedia 401A, BiMedia 402A, BiMedia 403A.

Среду BiMedia 403A (401A, 402A) оставляют уравновеситься при комнатной температуре в течение 12 ч. Устанавливают температуру 37 °С на приборе «Бак Трак».

В основном меню программы «Бак Трак» устанавливают следующие параметры.

Параметры для инкубаторного блока (Adjust parameters)

Время исследованийц (Duration)	36 ч
Масштаб измерений (Scale)	
М-параметр	0—20 %

Е-параметр	0—80 %
Время задержки (Delay)	1 ч
Пороговые значения (Thresholds)	
М-параметр	5 %
Е-параметр	15 %
Проводить учет результатов по Е-параметру	
Пороговое значение по времени (Time limit)	30 ч

Добавляют в каждую измерительную ячейку по 10 см^3 среды BiMedia и вносят по 0,1 см^3 предобогащенного образца, тщательно перемешивают содержимое, вращая ячейку между ладонями (не переворачивая).

Для контроля среды используют одну измерительную ячейку с 10 см^3 среды BiMedia (без инокулята).

Выбирают в основном меню программы ЗАПУСК ИЗМЕРЕНИЙ (Start Measurement) и начинают измерения.

После того как каждая позиция в блоке будет отмаркирована как свободная на экране монитора, измерительные ячейки помещают в прибор «Бак Трак». Измерение начинается автоматически через 1 ч после загрузки ячеек в прибор. Рост микроорганизмов и время определения изменения импеданса (IDT) записываются автоматически.

Учет результатов.

Образец загрязнен листериями, если изменение импеданса превышает 15 %-ное пороговое значение по Е-параметру в течение 30 ч.

Подтверждение Listeria-позитивных образцов. В случае положительного ответа на листерии проводится подтверждение роста и идентификация до L. monocytogenes с высевом на селективные питательные среды в соответствии с п.п. 6.3—6.8. Высев производится непосредственно из измерительной ячейки.

Выросшие культуры подвергают идентификации по п. 6.8.

Учет результатов и выдача ответа по п. 6.9.

8. Выявление Listeria monocytogenes в реакции нарастания титра фага (РНФ)

РНФ может быть использована в качестве дополнительного метода для обнаружения L. monocytogenes в пищевых продуктах (при проведении противоэпидемических мероприятий и при эпидрасследовании).

Реакция нарастания титра фага – быстрый специфический метод обнаружения листерий, обеспечивающий выявление возбудителя в исследуемом материале без выделения культуры.

РНФ основана на свойстве индикаторного бактериофага строго специфично размножаться в клетках гомологичного микроба. Размножение бактериофага сопровождается увеличением количества его частиц и повышением титра.

8.1. В реакции применяют листериозные бактериофаги L2A и L4A. Штаммы L. monocytogenes I (9—127) и II (9—72) серогрупп. Питательные среды, содержащие 0,5 % глюкозы: мясопептонный бульон, 1,5 %-ный и 0,7 %-ный мясопептонный агар.

8.2. При постановке РНФ с пробами пищевых продуктов отвешивают 25 г исследуемого материала, измельчают, помещают в колбу емкостью 1 000 см^3 и добавляют 250 см^3 МПБ. Смесь в течение 5—10 мин встряхивают, затем 9 см^3 переносят в бактериологическую пробирку № 1 (опыт).

8.3. Бактериофаги используют в рабочем разведении (10 000 фаговых корпускул в 1 см^3). Для этого их растворяют в МПБ до исходного объема, указанного на этикетке ампулы, а затем на МПБ отдельными пипетками делают пять последовательных десятикратных разведений (в последнем разведении титр бактериофага составит 1×10^4).

Смесь фагов готовят путем смешивания равных объемов фага L2A и L4A в рабочем разведении.

8.4. Для контроля титра бактериофага, который ставят один на группу анализов, проводимых одновременно, в пробирку № 2 (контроль) вносят 9 см^3 МПБ.

8.5. В пробирки № 1 и 2 вносят по 1 см^3 смеси фага в рабочем разведении (рис. 2) и выдерживают их в течение 16—24 ч при комнатной температуре, после чего в пробирки добавляют по 1 см^3 хлороформа. Содержимое тщательно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30—40 мин. Хлороформ оседает на дно, надосадочную жидкость подвергают дальнейшим исследованиям.

8.6. При использовании смеси фагов из опытной и контрольной пробирок (№ 1 и 2) берут по 0,2 см^3 и переносят по 0,1 см^3 в две пробирки, содержащие по 0,9 см^3 МПБ (один ряд для обнаружения фага L2A, а другой – L4A), а затем из каждой пробирки готовят еще одно десятикратное разведение.

8.7. Готовят взвесь штаммов I и II серогруппы по стандарту мутности 10 ед. путем разведения суточной агаровой культуры в физиологическом растворе. Во все пробирки с разведенным материалом добавляют по 0,1 см^3 взвеси, штамма 1 серогруппы для выявления фага L2A или штамма II серогруппы для обнаружения фага L4A.

Содержимое пробирок засевают методом агаровых слоев по Грациа. Для этого накануне дня исследования в бактериологические чашки Петри разливают по 10 см^3 1,5 %-ного МПА; МПА можно разлить в чашки Петри и в день исследования, но в этом случае поверхность агара необходимо предварительно подсушить в течение 40—50 мин при 37 °С или 2 ч при комнатной температуре. Для второго слоя используют расплавленный и охлажденный до 48—50 °С 0,7 %-ный МПА, который следует использовать в течение часа, так как позже он приобретает гелеобразную консистенцию и непригоден для исследования.

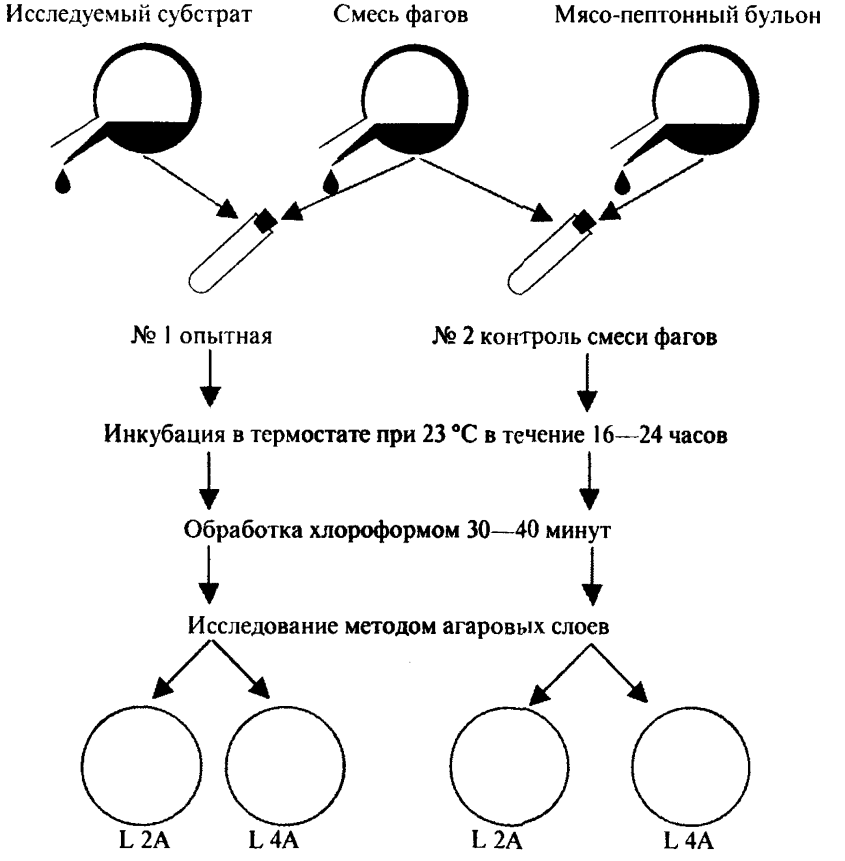


Рис. 2. Схема постановки РНФ для обнаружения листерий.

Затем в пробирки пипеткой вносят по 2,5—3 см^3 расплавленного и охлажденного до 48—50 °С 0,7 %-ного МПА. Содержимое быстро и тщательно перемешивают вращением пробирки между ладонями и выливают в чашку Петри. Смесь легким покачиванием чашки равномерно распределяют вторым слоем на поверхности 1,5 %-ного МПА. Чашки оставляют на ровном месте на 20—30 мин (до застывания 0,7 %-ного МПА), затем переворачивают и инкубируют при комнатной температуре.

8.8. Учет реакции проводят через 16—24 ч инкубирования посевов.

В опытных пробах и контроле титра фага подсчитывают число негативных колоний во всех чашках. Негативные колонии – округлые, хорошо заметные на фоне бактериального роста, прозрачные участки, образующиеся в результате лизиса бактерий.

При учете результатов сравнивают количество негативных колоний на чашках соответствующих разведений.

8.9. Результаты реакции оценивают по увеличению титра бактериофага (количества негативных колоний):

- увеличение количества негативных колоний в опытной пробе по отношению к контролю в 5 и более раз (хотя бы по одному из разведений) оценивается как положительный результат, менее чем в 5 раз – отрицательный;
- сплошной лизис или лизис с островками оценивается как положительный результат.

8.10. При получении положительного результата РНФ дают заключение, что в исследуемом материале (пробе) обнаружены бактерии рода Listeria.

9. Биологические исследования

Биологические исследования (постановку биопроб на мышах) выделенных культур и их серологическую диагностику в реакции агглютинации проводят в ходе противоэпидемических мероприятий и при эпидрасследовании заболеваний в соответствии с методическими рекомендациями «Лабораторная диагностика листериоза животных и людей, меры борьбы и профилактики». М., 1987 (утв. 04.09.86) [16].

10. Требования безопасности

Исследования пищевых продуктов на наличие Listeria monocytogenes проводят в соответствии с СанПиН 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

Библиографические список

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

2. Положение о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554.

3. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554.

4. СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

5. ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических исследований».

6. ГОСТ 26669—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

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

8. ГОСТ 10444.1—84 «Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

9. ГОСТ 9225—84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа».

10. ГОСТ 9792—73 «Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб».

11. ГОСТ 9958—81 «Изделия колбасные и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа».

12. ГОСТ 21237—75 «Мясо. Методы микробиологического анализа».

13. ГОСТ 4288—76 «Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса. Правила приемки и методы испытания».

14. ГОСТ 7631—85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний».

15. МУК 4.2.590—96 «Бактериологические исследования с использованием микробиологического экспресс-анализатора «Бак Трак 4100» / Минздрав России. М., 1997.

16. Методические рекомендации «Лабораторная диагностика листериоза животных и людей, меры борьбы и профилактики». (утв. Минздравом СССР 04.09.86).

17. «Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях». (утв. Главветупром; согл. зам. Главного государственного санитарного врача СССР 30.08.90).

18. СанПиН 2.3.4.050—96 «Производство и реализация рыбной продукции».

19. СанПиН 2.3.4.545—96 «Производство хлеба, хлебобулочных и кондитерских изделий».

20. СанПин 2.3.4.551—96 «Производство молока и молочных продуктов».

21. СанПиН 42—123—4423—87 «Нормативы и методы микробиологического контроля продуктов детского питания, изготовленных на молочных кухнях системы здравоохранения».

22. СанПиН 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

23. СанПиН 2.3.6.1066—01 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации торговли и обороту в них продовольственного сырья и пищевых продуктов».

24. «Инструкция по порядку и периодичности контроля за содержанием микробиологических и химических загрязнителей в молоке и молочных продуктах на предприятиях молочной промышленности» (утв. Минсельхозпродом России, согл. Госкомсанэпиднадзором России 28.12.95).

25. «Санитарные правила для предприятий пищеконцентратной промышленности» (утв. Минздравом СССР 01.03.76).

26. «Ветеринарно-санитарные правила для предприятий (цехов) переработки птицы и производства яйцепродуктов» (утв. Минздравом СССР 6.03.87).

27. «Инструкция по порядку и периодичности контроля за содержанием микробиологических и химических загрязнителей в мясе, птице, яйцах и продуктах их переработки» (утв. Минсельхозпромом России; согл. Минздравом России 27.06.00).

28. «Инструкция по микробиологическому контролю производства мороженого» (утв. ТК 186 по стандартизации (молоко и молочные продукты); согл. зам. Главного государственного санитарного врача России 10.03.93).

29. «Инструкция по санитарно-бактериологическому контролю производства маргарина и майонеза на предприятиях маргариновой промышленности» (утв. Госагропромом СССР 21.11.88).

30. «Порядок санитарно-микробиологического контроля при производстве мяса и мясных продуктов» (утв. Минсельхозпромом России 15.12.95).

31. «Инструкция по микробиологическому контролю производства высокостойких безалкогольных напитков. ИК 10—5031536—105—91» (утв. Госагропромом СССР; согл. Минздравом СССР 28.06.91).

32. «Инструкция по микробиологическому контролю быстрозамороженной плодоовощной продукции» (утв. Госагропромом СССР; согл. Минздравом СССР 29.09.89).

33. МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов».

gost.e-ecolog.ru