

**Методы выявления патогенных микроорганизмов
с использованием иммунохроматографических
экспресс-тестов производства Merck (Германия)**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Мерск (Германия): Методические рекомендации.- М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.- 23 с.

1. Разработаны: Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Брагина И.В., Кривопалова Н.С, Минаева Н.А.), Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной вирусологии и микробиологии (Котляров В.М., Фирсова Т.Е., Чевелева С.С.), МУП «Уфаводоканал» (Кантор Л.И., Труханова Н.В., Майтова Р.Ф.), центром госсанэпиднадзора в Южном Административном округе г.Москвы (Митрофанова Т.А., Чернявский Г.И., Гудков А.А.).
2. Утверждены и введены в действие Заместителем главного государственного санитарного врача Российской Федерации – Главным врачом Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России Е.Н.Беляевым 04.03.2004 г.
3. Введены впервые.

Содержание

Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Merck (Германия)	4
1. Общие положения и область применения.....	4
2. Нормативные ссылки.....	4
3. Требования к помещениям и технике безопасности	5
4. Аппаратура, материалы, питательные среды и экспресс-тесты.....	5
5. Описание и принцип действия экспресс-тестов.....	7
6. Сущность метода.....	8
7. Методы отбора и подготовки проб.....	8
8. Выявление бактерий <i>Listeria monocytogenes</i>	8
9. Выявление бактерий рода <i>Salmonella</i>	11
10. Выявление бактерий <i>E.coli</i> O157:H7.....	17
11. Выявление бактерий рода <i>Campylobacter</i>	19
12. Выявление веротоксинов VT1 и VT2 энтерогеморрагических штаммов <i>E.coli</i>	21
13. Использование Singlepath-тестов для идентификации патогенных микроорганизмов...	23

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Главного государственного
санитарного врача Российской Федерации -
Главный врач Федерального центра
госсанэпиднадзора Минздрава России
Е.Н.Беляев

04 марта 2004 г.
№ 24ФЦ /976
Дата введения: 04 марта 2004 г.

Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Merck (Германия)

Методические рекомендации

1. Общие положения и область применения

- 1.1. Настоящие методические рекомендации устанавливают методы проведения лабораторных исследований по выявлению бактерий рода *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *E.coli* O157:H7, веротоксинов энтерогеморрагических штаммов *E.coli* с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов Singlepath[®] и Duopath[®] в пищевых продуктах и продовольственном сырье, водных объектах окружающей среды и биоматериале от человека.
- 1.2. Методические рекомендации разработаны в соответствии с Федеральным законом «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», Положением о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, Положением о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации.
- 1.3. Методические рекомендации предназначены для применения в лабораториях организаций, независимо от форм собственности, осуществляющих производственный контроль продовольственного сырья и пищевых продуктов в лабораториях учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации и санитарно-эпидемиологической службы федеральных органов исполнительной власти, осуществляющих государственный и ведомственный контроль, а также в лабораториях других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения испытаний указанной продукции для целей сертификации.

2. Нормативные ссылки

- 2.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52–ФЗ от 30 марта 1999 г.
- 2.2. Закон РФ «О защите прав потребителей» от 7 февраля 1992 г.
- 2.3. Закон РФ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» № 29–ФЗ от 2 января 2000 г.

- 2.4. “Положение о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации”, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации № 554 от 24 июля 2000 г.
- 2.5. “Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании”, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации № 554 от 24 июля 2000 г.
- 2.6. СП 1.2.731–99 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.
- 2.7. ГОСТ 26668–85 “Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов”.
- 2.8. ГОСТ 26669–85 “Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов”.
- 2.9. ГОСТ 26670–91 “Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов”.
- 2.10. ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) “Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований”.
- 2.11. ГОСТ 30519-97/ГОСТ Р 50480-93 “Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella*.”
- 2.12. МУ 2.1.5.800-99 Организация госсанэпиднадзора за обеззараживание сточных вод.
- 2.13. МУК 4.2.992-00 от 04.11.2000г. Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157-H7
- 2.14. ГОСТ 51921-2002 Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*.
- 2.15. МУК 4.2.1122-02 Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах.
- 2.16. МУ № 04-23/3 от 17.12.84г. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний вызываемых энтеробактериями.
- 2.17. Инс.№15-6/28 от 21.11.89г. Инструкция по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза.
- 2.18. ГОСТ 19569-89 Стерилизаторы паровые медицинские. Общие технические требования и методы испытаний.
- 2.19. ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.
- 2.20. ГОСТ 29227-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть1. Общие требования.
- 2.21. ГОСТ 16317-87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия.
- 2.22. ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.
- 2.23. ГОСТ 23932-90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия.
- 2.24. ГОСТ 18300 –87 Спирт этиловый ректифицированный. Технические условия.

3. Требования к помещениям и технике безопасности

- 3.1. Требования безопасности, общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны удовлетворять требованиям СП 1.2.731, ГОСТ Р 51446.
- 3.2. Лаборатория должна иметь разрешение на работу с микроорганизмами III-IV групп патогенности.

4. Аппаратура, материалы, питательные среды и экспресс-тесты*

- 4.1. Термостат электрический с диапазоном измерения от 15 до 65⁰С с допустимой погрешностью регулирования ТУ 64-1-1382-83

* Производство питательных сред и экспресс-тестов компании Merck KGaA (Германия) имеет международный сертификат качества ISO 9001:2000.

	температуры $\pm 1^{\circ}\text{C}$.	
4.2.	Автоклав или стерилизатор паровой медицинский.	ГОСТ 19569
4.3.	Шкаф сушильно-стерилизационный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима в диапазоне от 50 до 200 $^{\circ}\text{C}$ с погрешностью $\pm 2^{\circ}\text{C}$.	
4.4.	Гомогенизатор бактериологический перистальтического типа Masticator (или аналогичный) со стерильными полиэтиленовыми пакетами.	
4.5.	Облучатель бактерицидный	
4.6.	Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 200г и допустимой погрешностью ± 2 мг	ГОСТ 24104
4.7.	Холодильник позволяющий поддерживать температуру +2-4 $^{\circ}\text{C}$	ГОСТ 16317
4.8.	Водяная баня с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру 100 $\pm 2^{\circ}\text{C}$.	ТУ 42-22-608-75
4.9.	Пипетки градуированные исполнения 1, 2 классов точности вместимостью 1 см 3 , 10 см 3 .	ГОСТ 29227
4.10.	Пробирки бактериологические вместимостью не менее 10см 3	ГОСТ 25336
4.11.	Посуда широкогорлая	ГОСТ 25336
4.12.	Singlepath[®]-L.'mono тест	Merck, Cat.№1.04148.0001
4.13.	Бульон Фразера - Fraser broth	
4.13.1.	Основа бульона Фразера – Fraser Listeria Selective Enrichment Broth (base)	Merck, Cat. №1.10398.0500
4.13.2.	Селективная добавка для бульона Фразера – Fraser Listeria Supplement	Merck, Cat. №1.10399.0001
4.14.	Забуференный бульон для обогащения листерий - Buffered Listeria Enrichment Broth (BLEB)	
4.14.1.	Основа забуференного бульона для обогащения листерий - Listeria Enrichment Broth, buffered (base)	Merck, Cat. №1.11781.0500
4.14.2.	Селективная добавка к бульону для обогащения листерий - Listeria Selective Enrichment Supplement	Merck, Cat. №1.11781.0001
4.15.	ПАЛКАМ agar - PALCAM Agar	
4.15.1.	Основа ПАЛКАМ агара - PALCAM Listeria Selective Base	Merck, Cat.№1.11755.0500
4.15.2.	Селективная добавка для ПАЛКАМ агара – PALCAM Listeria Selective Supplement	Merck, Cat.№1.12122.0001
4.16.	ОКСФОРД agar – OXFORD Agar	
4.16.1.	Основа Оксфорд агара - Oxford Listeria Selective Agar Base	Merck, Cat.№1.07004.0500
4.16.2.	Селективная добавка для Оксфорд агара - Oxford Listeria Selective Supplement	Merck, Cat.№1.07006.0001
4.17.	Singlepath[®]-Salmonella тест	Merck, Cat.№1.04140.0001
4.18.	Забуференная пептонная вода – Peptone water (buffered)	Merck, Cat.№1.07228.0500
4.19.	Селективная среда Раппапорт-Василиадис (магниевая) – Selective Enrichment Broth Rappaport-Vassiliadis (RVS)	Merck, Cat.№1.07700.0500
4.20.	Селенитовая среда – Selenite Enrichment Broth Leifson	Merck, Cat.№1.07717.0500
4.21.	Тетратионатная среда – Tetrathionate Broth Muller-Kauffmann	Merck, Cat.№1.10863.0500

4.22.	РАМБАХ агар – RAMBACH® Agar	Merck, Cat.№1.07500.0001
4.23.	Salmosyst® бульон – Salmosyst® Broth Base	Merck, Cat.№1.10153.0500
4.24.	Salmosyst® селективная добавка - Salmosyst® Selective Supplement	Merck, Cat.№1.10141.0001
4.24.	Singlepath®-E.coli O157 тест	Merck, Cat.№1.04141.0001
4.25.	Модифицированный ЕС бульон с новобиоцином – mEC Broth with Novobiocin (mEC)	Merck, Cat.№1.14582.0500
4.26.	Модифицированный триптиказо-соевый бульон с новобиоцином – mTryptic-Soy-Broth with Novobiocin (mTSBN)	Merck, Cat.№1.09205.0500
4.27.	Агар Мак-Конки с сорбитолом – Sorbitol-MacConkey Agar (SMAC Agar)	Merck, Cat.№1.09207.0500
4.28.	Singlepath®-Campylobacter тест	Merck, Cat.№1.04141.0001
4.29.	Селективный бульон Болтона – Bolton Selective Enrichment Broth	
4.29.1.	Основа селективного бульона Болтона - Bolton Selective Enrichment Broth	Merck, Cat.№1.00068.0500
4.29.2.	Селективная добавка для бульона Болтона – Bolton Broth Selective Supplement	Merck, Cat.№1.00069.0001
4.30.	Газогенерирующие пакеты - Anaerocult-C	Merck, Cat.№1.16275.0001
4.31.	Campylobacter селективный агар – Campylobacter Selective Agar	
4.31.1.	Основа для Campylobacter селективного агара - Campylobacter Selective Agar Base	Merck, Cat.№1.02248.0500
4.31.2.	Селективная добавка для Campylobacter селективного агара - Campylobacter Selective Supplement	Merck, Cat.№1.02249.0001
4.32.	Duopath®-Verotoxins тест	Merck, Cat.№1.04144.0001
4.33.	Агар Мак-Конки с сорбитолом усиленной селективности - CT-SMAC Agar	
4.33.1.	Агар Мак-Конки с сорбитолом – (SMAC agar)	Merck, Cat.№1.09207.0500
4.33.2.	Селективная добавка для CT-SMAC-агара – CT-Supplement	Merck, Cat.№1.09202.0001
4.34.	CAYE бульон – CAYE Broth	
4.34.1.	Основа CAYE бульона – CAYE Broth Base	Merck, Cat.№1.00060.0100
4.34.2.	Добавка (индуктор) к основе CAYE бульона – CAYE broth Supplement	Merck, Cat.№1.00051.0001
4.35.	Раствор полимиксина 0.5%	Merck, Cat.№1.09875.0001

Допускается использование оборудования импортного производства аналогичного назначения.

5. Описание и принцип действия экспресс-тестов

Иммунохроматографические экспресс-тесты Singlepath и Duopath предназначены для выявления бактерий рода *Salmonella*, *Listeria*, *E.coli*O157 и веротоксинов энтерогеморрагических штаммов *E.coli*.

Экспресс-тесты представляет собой диагностическую тест-панель с лункой для внесения образца, и окном с тестовой и контрольной зонами. Экспресс-тест содержит иммобилизованные на подложке меченые золотом антитела, обладающие высокой специфичностью к определяемым бактериям или веротоксинам.

Принцип действия экспресс-тестов основан на методе визуальной иммунохроматографии - разновидности иммуноферментного анализа. Антигены определяемых бактерий или веротоксинов, присутствующие в исследуемом образце, взаимодействуют с мечеными золотом антителами с образованием комплекса антиген-антитело. При прохождении по подложке теста комплекс антиген-антитело связывается с иммобилизованными антителами с образованием красных линий в тестовой и контрольной зонах.

6. Сущность метода

Метод выявления бактерий рода *Salmonella*, *Listeria*, *E.coli* O157:H7 и веротоксинов энтерогеморрагических штаммов *E.coli* основан на визуальном определении наличия линий в тестовой и контрольной зонах Singlepath и Duopath тестов при исследовании предварительно обогащенного образца.

7. Методы отбора и подготовки проб

Отбор и подготовку проб проводят в соответствии с ГОСТ 26668, ГОСТ 26669 и другими действующими ГОСТ и НД на анализируемый вид образцов. Биоматериал - в соответствии с МУ № 04-23/3.

8. Выявление бактерий *Listeria monocytogenes*

8.1. Используемые тесты и питательные среды

- 8.1.1. Singlepath-L.'mono тест (4.12).
- 8.1.2. Бульон Фразера (п.4.13).
- 8.1.3. Забуференный бульон для обогащения листерий (BLEB) (п.4.14).
- 8.1.4. ПАЛКАМ агар (п.4.15).
- 8.1.5. ОКСФОРД агар (п.4.16).

Приготовление питательных сред проводят в соответствии с инструкциями фирмы изготовителя.

8.2. Предварительное селективное обогащение.

Навеску анализируемого образца массой (25 ± 0.1) г или объемом (25 ± 0.1) см³ вносят в 225 см³ бульона Фразера половинной концентрации (п.8.1.2). При необходимости анализа других масс (объемов) образца их посев проводят в бульон Фразера половинной концентрации в соотношении 1:9 по объему.

Твердые образцы измельчают в гомогенизаторе (п.4.4).

Посевы инкубируют при температуре (30 ± 1)°С в течение (21 ± 3) ч.

8.3. Селективное обогащение

0,1 см³ обогащенной культуры после инкубирования по п.8.2. перенести в 9,9 см³ бульона Фразера (п.8.1.2) или забуференного бульона для обогащения листерий (BLEB) (8.1.3).

Посевы инкубировать при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч.

8.4. Singlepath-тестирование

Перенести 160 мкл культуры (п.8.3) в лунку для внесения образца Singlepath-теста (п.8.1.1).

Примечание: тестирование провести не позднее 2 часов после вскрытия индивидуальной упаковки теста.

Считать результаты через 30 минут. Проверить наличие линий в тестовой (Т) и контрольной (С) зонах Singlepath-теста.

Результат теста считается положительным, если красная линия присутствует как в тестовой (Т), так и в контрольной (С) зоне.

Результат теста считается отрицательным, если красная линия присутствует только в контрольной (С) зоне.

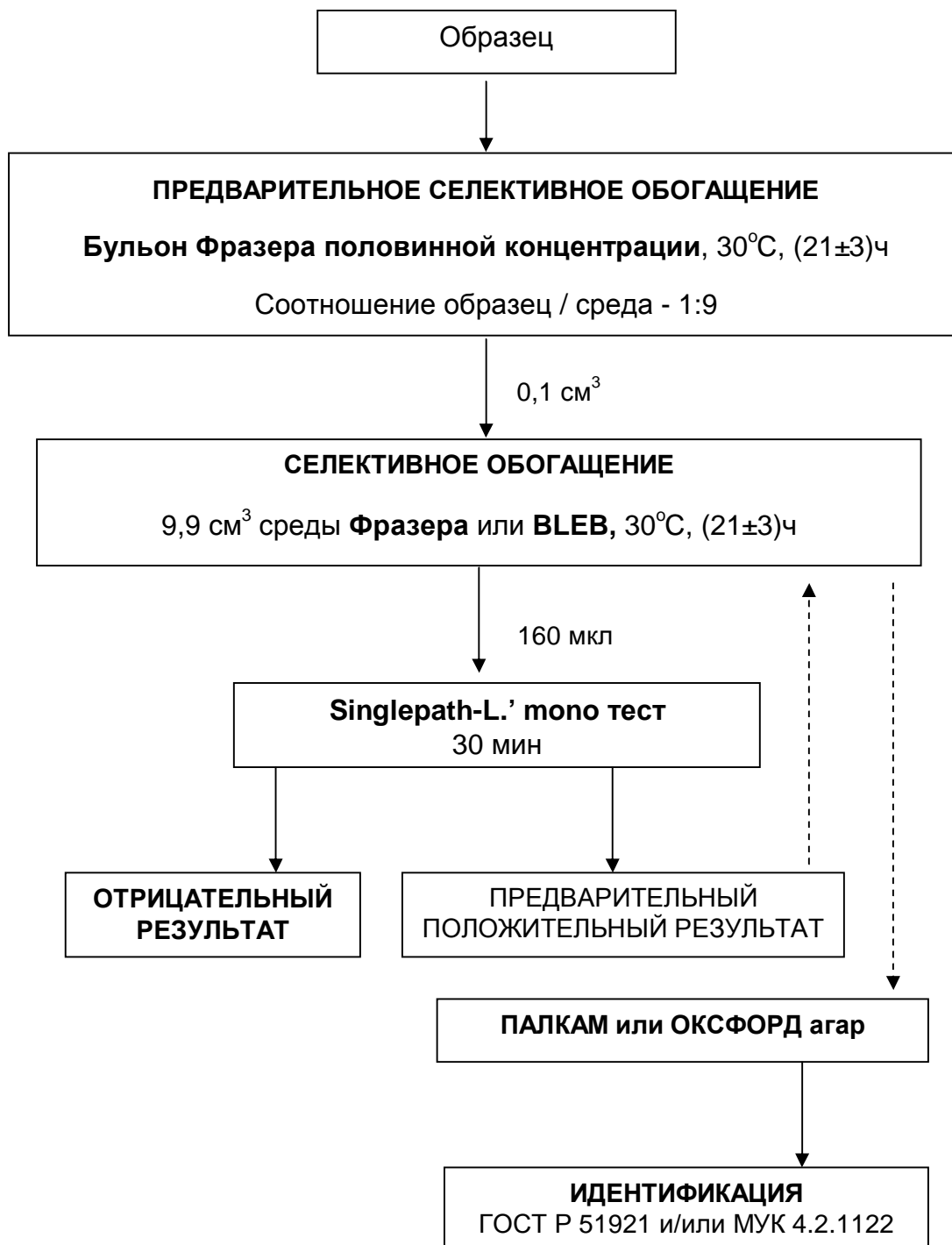
Результат теста считается недействительным, если красная линия отсутствует как в тестовой (Т), так и в контрольной (С) зоне.

Примечание: нижний предел чувствительности метода - 10^4 - 10^6 бактерий/ см^3 .

Положительные результаты подтвердить, используя дифференциально-диагностические среды – ПАЛКАМ агар (п.8.1.4) или ОКСФОРД агар (п.8.1.5), в соответствии ГОСТ Р 51921 или МУК 4.2.1122.

Испытания проводить по схеме №1.

Выявление *Listeria monocytogenes* с использованием экспресс-тестов Singlepath



9. Выявление бактерий рода *Salmonella*

9.1. Используемые тесты и питательные среды

- 9.1.1. Singlepath-Salmonella тест (п.4.17)
- 9.1.2. Забуференная пептонная вода (п.4.18).
- 9.1.3. Среда Раппапорт-Василиадис (магниева) (п.4.19).
- 9.1.4. Селенитовая среда (4.20).
- 9.1.5. Тетратионатная среда (4.21).
- 9.1.6. РАМБАХ-агар (п. 4.22).
- 9.1.7. Salmosyst (п.4.23).
- 9.1.8. Salmosyst селективная добавка (п.4.24).

Приготовление питательных сред проводят в соответствии с инструкциями фирмы изготовителя.

9.2. Неселективное обогащение

Навеску анализируемого образца массой (25 ± 0.1) г или объемом (25 ± 0.1) см³ вносят в 225 см³ забуференной пептонной воды (п.9.1.2). При необходимости анализа других масс (объемов) образца их посев проводят в забуференную пептонную воду в соотношении 1:9 по объему.

Твердые образцы измельчают в гомогенизаторе (п.4.4).

Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч

9.3. Селективное обогащение

0,1 см³ обогащенной культуры после инкубирования по п.9.2 перенести в 9,9 см³ среды Раппапорт-Василиадис (п.9.1.3).

Посевы инкубировать при температуре $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч

9.4. Инактивация

1-2 см³ культуры, полученной после селективного обогащения по п.9.3 перенести в пробирку. Инактивировать обогащенную культуру на водяной бане при температуре 100°C в течение 15 мин.

Оставшуюся после обогащения по п.9.3 культуру использовать для подтверждения положительных результатов.

9.5. Singlepath-тестирование

Инактивированную культуру по п.9.4. охладить до комнатной температуры.

Перенести 160 мкл инактивированной культуры в лунку для внесения образца Singlepath-теста (п.9.1.1).

Примечание: тестирование провести не позднее 2 часов после вскрытия индивидуальной упаковки теста.

Считать результаты через 20 минут.

Проверить наличие линий в тестовой (Т) и контрольной (С) зонах Singlepath-теста.

Результат теста считается положительным, если красная линия присутствует как в тестовой (Т), так и в контрольной (С) зоне.

Результат теста считается отрицательным, если красная линия присутствует только в контрольной (С) зоне.

Результат теста считается недействительным, если красная линия отсутствует как в тестовой (Т), так и в контрольной (С) зоне.

Примечание: нижний предел чувствительности метода 10^4 - 10^7 бактерий/см³.

Положительные результаты подтвердить, используя хромогенную среду РАМБАХ-агар (п.9.1.6), с последующей идентификацией сальмонелл по ГОСТ 30519.

Испытания проводить по схеме №2.

Дополнение №1.

Выявление бактерий рода Salmonella в водах поверхностных водоемов и сточных водах проводить по схеме №3.

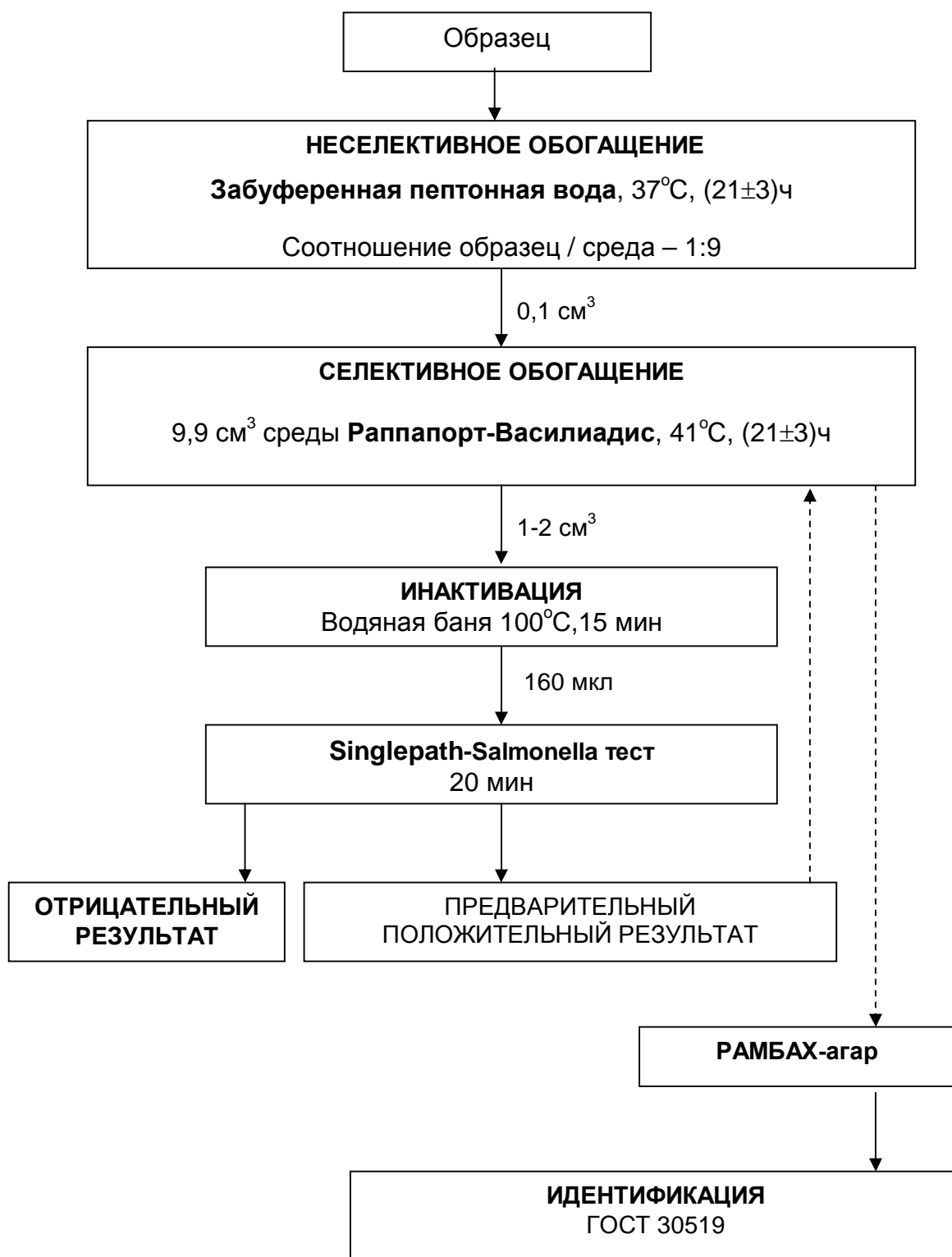
Дополнение №2.

Метод выявления бактерий рода Salmonella на хромогенной среде РАМБАХ-агар (п.9.1.6) приведен в схеме №4.

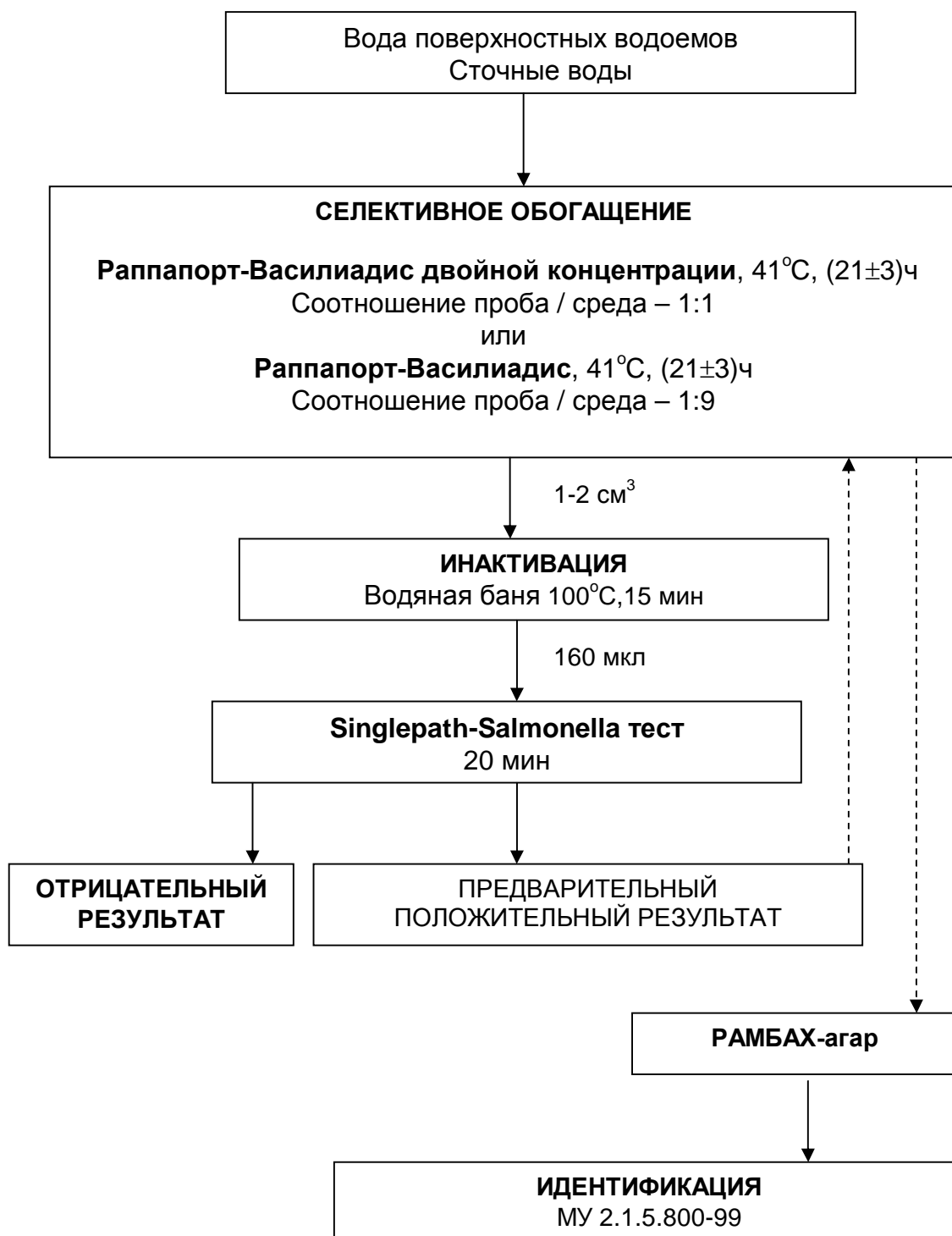
Дополнение №3.

Ускоренный метод выявления бактерий рода Salmonella с использованием селективной добавки Salmosyst (п.9.1.7, п.9.1.8) приведен на схеме №5.

Выявление бактерий рода *Salmonella* с использованием экспресс-тестов Singlepath



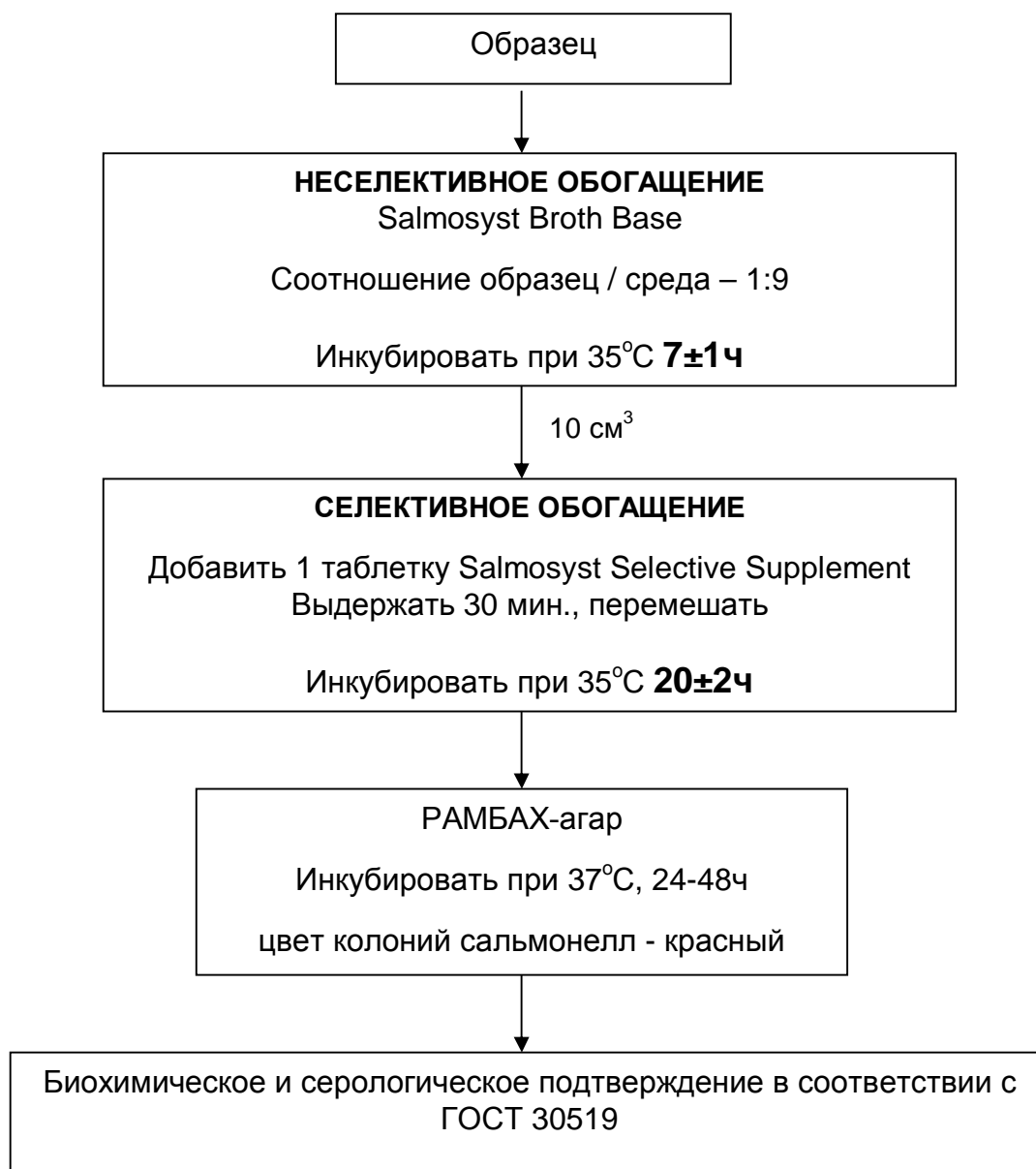
Выявление бактерий рода *Salmonella* в пробах воды с использованием экспресс-тестов Singlepath



Выявление бактерий рода *Salmonella* с использованием хромогенной среды РАМБАХ-агар



Ускоренный метод выявления бактерий рода *Salmonella* с использованием среды Salmosyst



10.Выявление бактерий E.coli O157

10.1. Используемые тесты и питательные среды

10.1.1. **Singlepath®-E.coli O157 тест**

10.1.2. Модифицированный ЕС бульон с новобиоцином – mEC (п.4.25).

10.1.3. Модифицированный триптиказо-соевый бульон с новобиоцином – mTSBN (п.4.26).

10.1.4. Агар Мак Конки с сорбитолом – SMAC agar (4.27).

10.1.5. Агар Мак-Конки с сорбитолом усиленной селективности - СТ-SMAC Agar (4.33).

Приготовление питательных сред проводят в соответствии с инструкциями фирмы изготовителя.

10.2. Селективное обогащение

Навеску анализируемого образца массой (25 ± 0.1) г или объемом (25 ± 0.1) см³ вносят в 225 см³ модифицированный ЕС бульон с новобиоцином – mEC (п.10.1.2) при исследовании мясных продуктов или модифицированный триптиказо-соевый бульон с новобиоцином - mTSBN (п.10.1.3) при исследовании молочных продуктов.

При необходимости анализа других масс (объемов) образцов их посев проводят в одну из селективных сред в соотношении 1:9 по объему.

Твердые образцы измельчают в гомогенизаторе (п.4.4).

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1)°C в течение (21 ± 3) ч

10.3 Инактивция

1-2 см³ культуры, полученной после предварительного обогащения по п.10.2 перенести в пробирку. Инактивировать обогащенную культуру на водяной бане при температуре 100°C 15мин.

10.4. Singlepath-тестирование

Инактивированную культуру по п.10.3. охладить до комнатной температуры.

Перенести 160мкл инактивированной культуры в лунку для внесения образца Singlepath-теста (п.10.1.1).

Примечание: тестирование провести не позднее 2 часов после вскрытия индивидуальной упаковки теста.

Считать результаты через 20 минут. Проверить на наличие линий в тестовой (Т) и контрольной (С) зонах Singlepath–теста.

Результат теста считается положительным, если красная линия присутствует как в тестовой (Т), так и в контрольной (С) зоне.

Результат теста считается отрицательным, если красная линия присутствует только в контрольной (С) зоне.

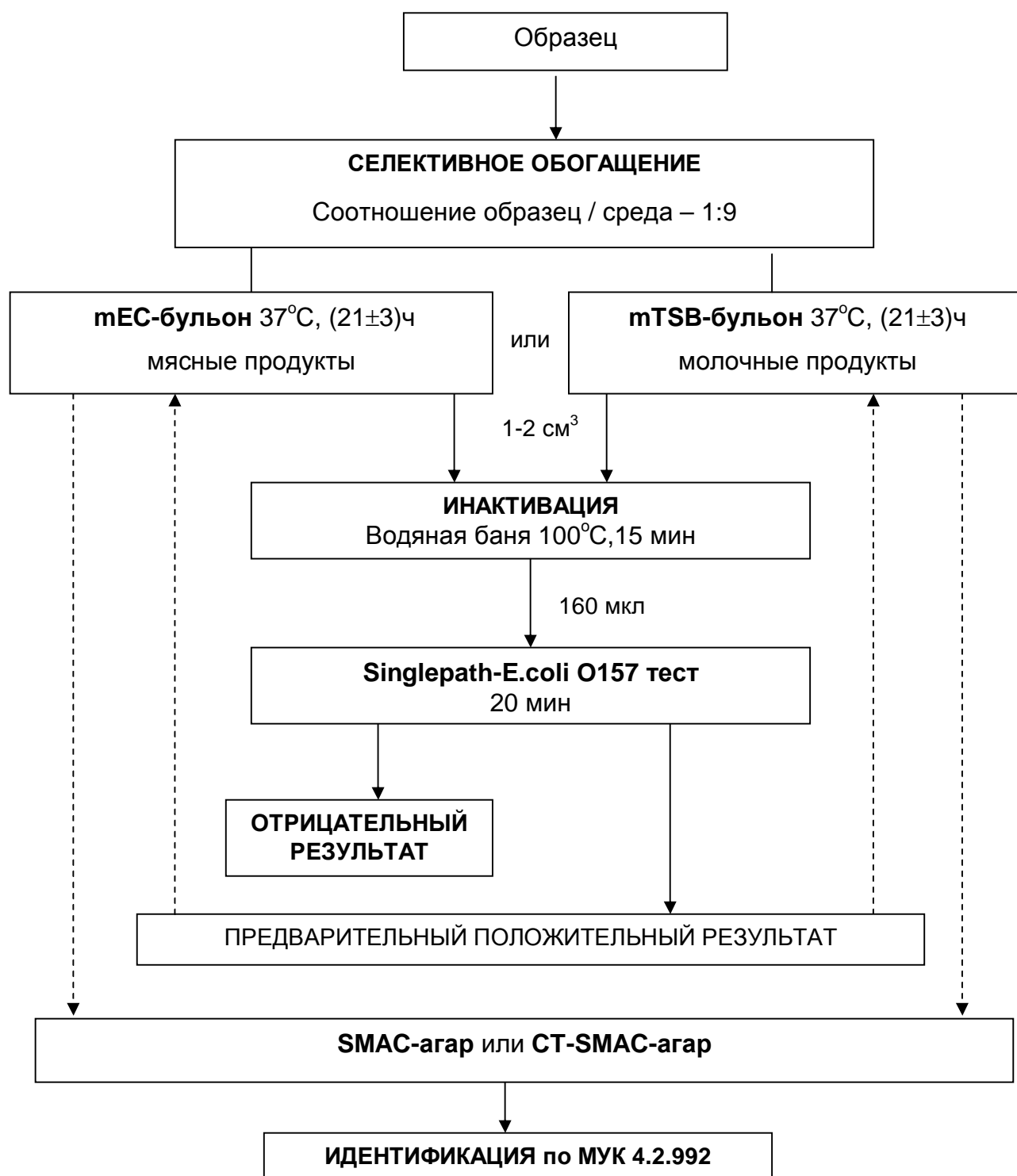
Результат теста считается недействительным, если красная линия отсутствует как в тестовой (Т), так и в контрольной (С) зоне.

Примечание: нижний предел чувствительности метода 10^4 - 10^6 бактерий/см³.

Положительные результаты подтвердить, используя SMAC-агар (п.10.1.4) или СТ-SMAC-агар (10.1.5), с последующей идентификацией в соответствии с МУК 4.2.992.

Испытания проводить по схеме №6.

Выявление бактерий *E.coli* O157 с использованием экспресс-тестов Singlepath



11. Выявление бактерий рода *Campylobacter*

11.1. Используемые тесты и питательные среды

11.1.1. Singlepath®-Campylobacter тест (п.4.28)

11.1.2. Селективный бульон Болтона (п.4.29)

11.1.3. Газогенерирующие пакеты - Anaerocult-C (4.30)

11.1.4. Campylobacter селективный агар (п.4.31).

Приготовление питательных сред проводят в соответствии с инструкциями фирмы изготовителя.

11.2. Селективное обогащение

Навеску анализируемого образца массой (25 ± 0.1) г или объемом (25 ± 0.1) см³ вносят в 225 см³ селективного бульона Болтона (п.11.1.2);

При необходимости анализа других масс (объемов) образца их посев проводят в селективный бульон Болтона соотношении 1:9 по объему.

Твердые образцы измельчают в гомогенизаторе (п.4.4).

Объем воздуха во флаконе (пробирке) после посева не должен превышать 10-15%. Если объем воздушного пространства превышает 15%, то культивирование ведут в микроаэрофильных условиях, используя для этого газогенерирующие пакеты Anaerocult-C (п.11.1.3).

Посевы инкубируют в два этапа:

- первый этап при температуре (37 ± 1)°C в течение 4ч.
- второй этап при температуре (41 ± 1)°C в течение (44 ± 2) ч

11.3. Инактивация

1-2 см³ культуры, полученной после селективного обогащения по п.11.2 перенести в пробирку. Инактивировать обогащенную культуру на водяной бане при температуре 100°C в течение 15 мин.

Оставшуюся после обогащения по п.11.2 культуру использовать для подтверждения положительных результатов.

11.3. Singlepath-тестирование

Инактивированную культуру по п.11.3. охладить до комнатной температуры.

Перенести 160 мкл инактивированной культуры в лунку для внесения образца Singlepath-теста (п.11.1.1).

Примечание: тестирование провести не позднее 2 часов после вскрытия индивидуальной упаковки теста.

Через 20 минут считать результаты. Проверить наличие линий в тестовой (Т) и контрольной (С) зонах Singlepath-теста.

Результат теста считается положительным, если красная линия присутствует как в тестовой (Т), так и в контрольной (С) зоне.

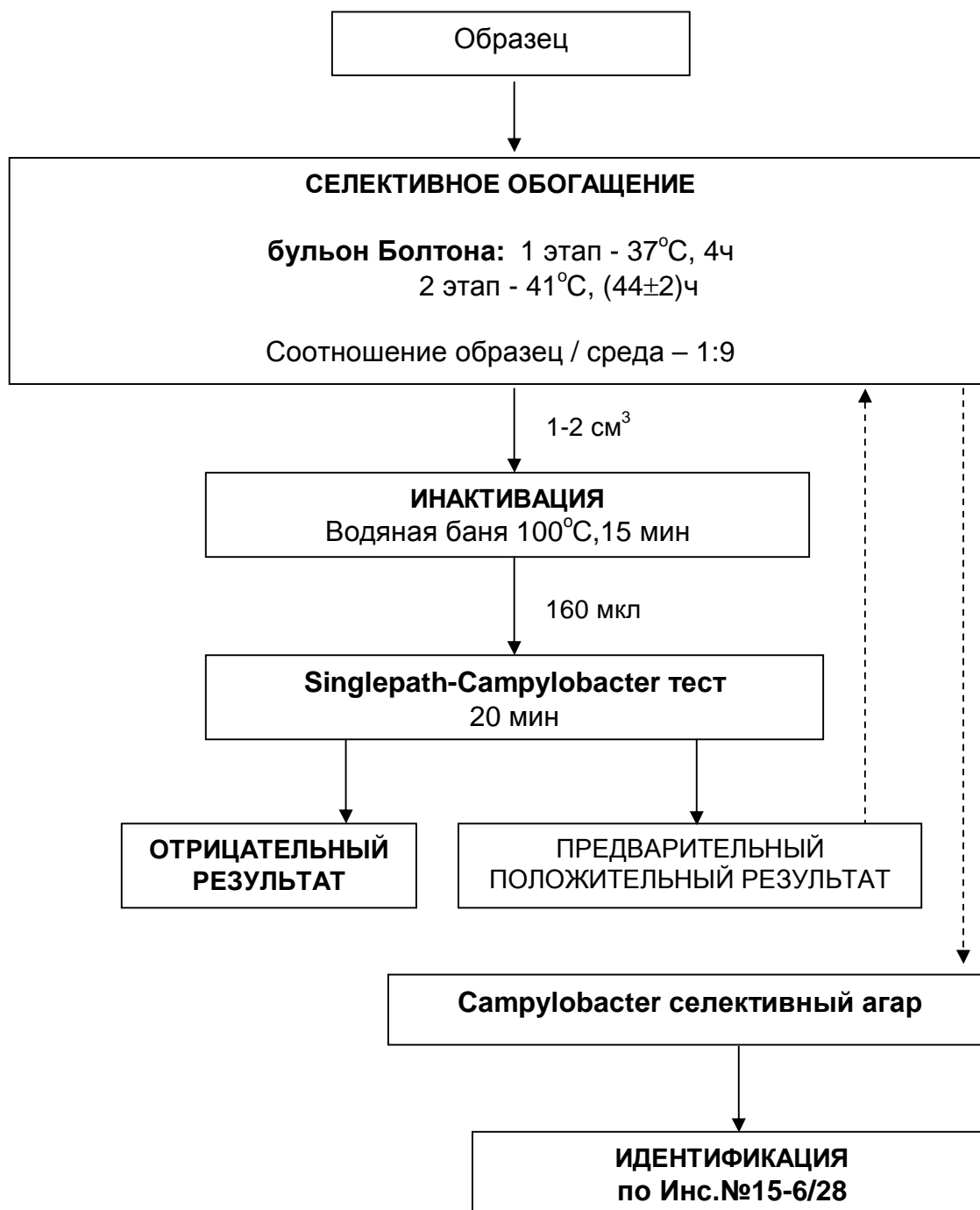
Результат теста считается отрицательным, если красная линия присутствует только в контрольной (С) зоне.

Результат теста считается недействительным, если красная линия отсутствует как в тестовой (Т), так и в контрольной (С) зоне.

Нижний предел чувствительности метода примерно 10^4 - 10^7 бактерий/см³.

Положительные результаты подтвердить, используя Campylobacter селективный агар (п.11.1.4), с последующей идентификацией в соответствии с Инструкцией №15-6/28.

Выявление бактерий рода *Campylobacter* с использованием экспресс-тестов Singlepath



12. Выявление веротоксинов VT1 и VT2 энтерогеморрагических штаммов E.coli .

11.2. Используемые тесты и питательные среды

11.2.1. Duopath®-Verotoxins тест (п.4.32)

11.2.2. Модифицированный ЕС бульон с новобиотином – mEC Broth (п.4.25)

11.2.3. Модифицированный триптиказо-соевый бульон с новобиотином – mTSBN (п.4.26)

11.2.4. Агар Мак-Конки с сорбитолом усиленной селективности - СТ-SMAC Agar (п.4.33).

11.2.5. САУЕ бульон (п.4.34)

11.2.6. Раствор полимиксина 0.5% (п.4.35)

Приготовление питательных сред проводят в соответствии с инструкциями фирмы изготовителя.

12.2. Селективное обогащение

Навеску анализируемого образца массой (25 ± 0.1) г или объемом (25 ± 0.1) см³ вносят в 225 см³ модифицированный ЕС бульон новобиотином – mEC (п.10.1.2) при исследовании мясных продуктов или модифицированный триптиказо-соевый бульон с новобиотином - mTSBN (п.10.1.3) при исследовании молочных продуктов.

При необходимости анализа других масс (объемов) образцов их посев проводят в одну из селективных сред в соотношении 1:9 по объему.

Твердые образцы измельчают в гомогенизаторе (п.4.4).

Посевы инкубировать при температуре (41 ± 1)°C в течение (21 ± 3) ч

12.3. Выделение чистой культуры

После инкубирования по п.12.2. обогащенную культуру пересеять на поверхность СТ-SMAC агара (12.1.4).

Посевы инкубировать при температуре (37 ± 1)°C в течение (21 ± 3) ч

12.4. Индукция синтеза веротоксинов

После инкубирования по п.12.3 внести 5-6 типичных колоний E.coli O157 в 1см³ САУЕ бульона (п.12.1.5), содержащий индуктор синтеза веротоксинов.

Посевы инкубировать при температуре (37 ± 1)°C в течение 6 часов.

12.5. Инактивация

Перенести 180мкл культуры, полученной по п.12.4 в пробирку-эппендорф. Добавить 20мкл раствора полимиксина (п.12.1.6) и перемешать.

Инкубировать при температуре (37 ± 1)°C в течение 10мин.

12.6. Duopath-тестирование

Инактивированную культуру по п. 12.5. охладить до комнатной температуры и перемешать с помощью миксера Vortex.

Перенести 160мкл инактивированной культуры в лунку для внесения образца Singlepath-теста (п.12.1.1).

Примечание: тестирование провести не позднее 2 часов после вскрытия индивидуальной упаковки теста.

Считать результаты через 20 минут. Проверить на наличие линий в тестовой (VT1 и VT2) и контрольной (C) зоне Duopath–теста.

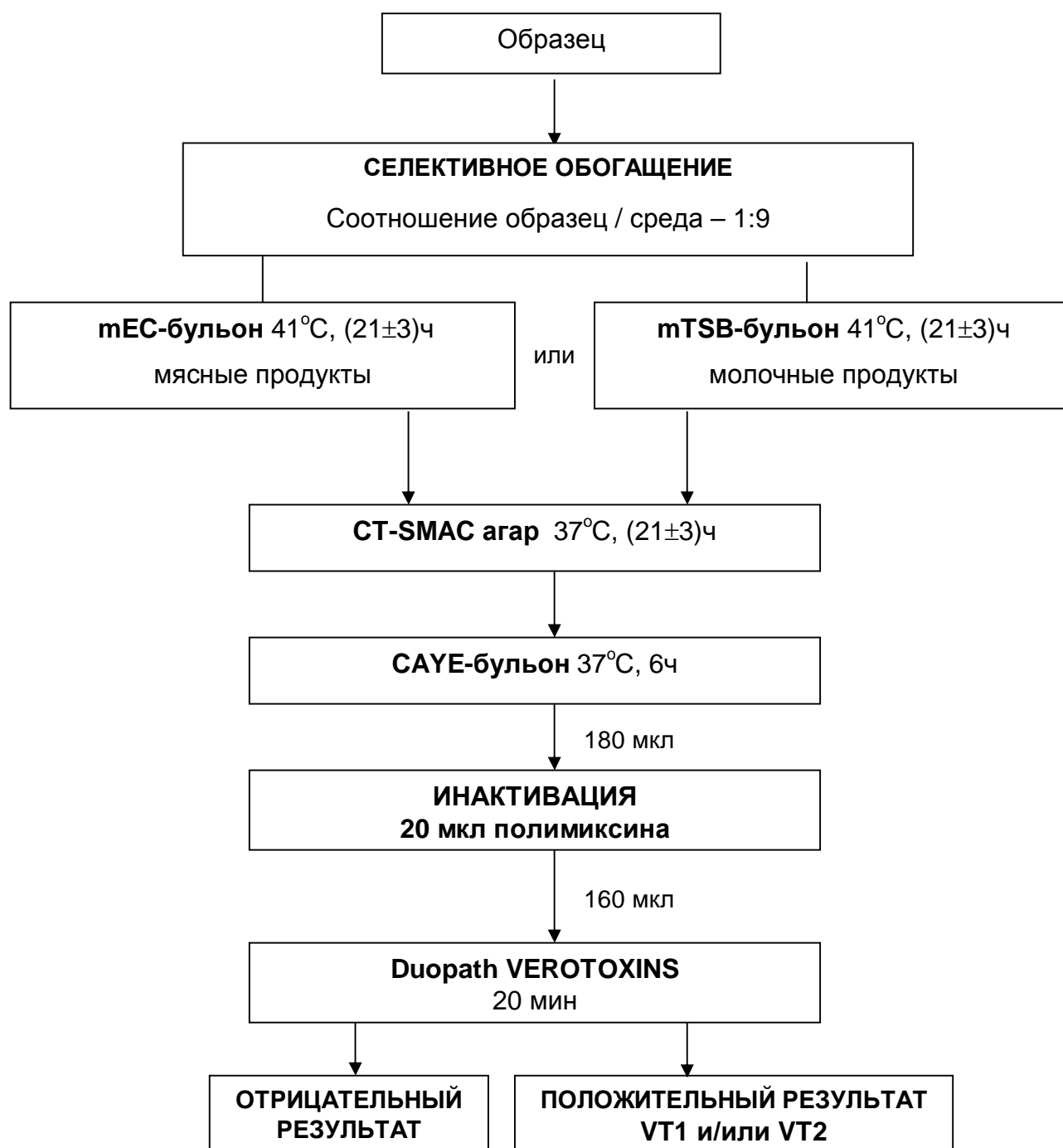
Результат теста считается положительным, если красная линия присутствует как в тестовой (VT1 и/или VT2), так и в контрольной (C) зоне.

Результат теста считается отрицательным, если красная линия присутствует только в контрольной (C) зоне.

Результат теста считается недействительным, если красная линия отсутствует как в тестовой (VT1 и VT2), так и в контрольной (C) зоне.

Испытания проводить по схеме №8.

**Выявление веротоксинов VT1 и VT2
энтерогеморрагических штаммов E.coli
с использованием экспресс-тестов Duopath**



13. Использование Singlepath-тестов для идентификации патогенных микроорганизмов

