УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН

«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

_____ И.А. Дятлов

« ____ » _____ 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению питательного агара для выделения листерий сухого (ПАЛ)
для санитарно-бактериологических исследований

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Питательный агар для выделения листерий сухой (ПАЛ)», далее по тексту – среда ПАЛ, предназначена для выделения *Listeria spp.* из пищевых продуктов, кормов для животных и других объектов при санитарно-бактериологических исследованиях. Не является медицинским изделием.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Среда ПАЛ выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г, селективная добавка (СД)¹ выпускается в стеклянных флаконах по 0,05 г (на одну банку со средой ПАЛ - 5 флаконов с СД).

Среда ПАЛ представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный, светочувствительный порошок светло-желтого цвета, который получают смешиванием сухих компонентов.

СД представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный, светочувствительный порошок розоватого цвета.

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Высокое содержание питательных веществ создает оптимальные условия для роста листерий. Ингибитор - литий хлористый частично подавляет рост сопутствующей микрофлоры при культивировании и выделении *Listeria spp.*

Выделение листерий основано на их способности гидролизовать эскулин с образованием эскулетина, который в присутствии ионов железа образует серо-зеленый комплекс с почернением среды вокруг колоний.

¹ Возможен выпуск среды ПАЛ без СД по требованию заказчика

2.2. СОСТАВ

Состав среды ПАЛ, г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки сухой (ПГРМ сухой)	7,5
Пептон мясной	7,5
Панкреатический гидролизат казеина сухой (ПГК сухой).....	10,0
Дрожжевой экстракт	2,0
Литий хлористый	13,0
Эскулин	0,8
Железо (III) лимонноаммиачное зеленое или железо (III) лимонноаммиачное коричневое	0,5
Натрий хлористый	3,5
Натрий углекислый	0,2±0,1
Агар бактериологический	11,0±3,0

Состав СД, г/л:

– Полимиксина В сульфат	0,01
– Налидиксовая кислота	0,025
– Акрифлавин	0,01
– Цефтазидим	0,005

рН от 6,7 до 7,1

Определение рН проводят потенциометрическим методом с применением стеклянного электрода в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» в экстракте, приготовленном путем добавления к 2,00 г сухой среды ПАЛ 100 мл дистиллированной воды. Величина рН, определенная по МУК 4.2.2316-08, является условной величиной, которая соответствует значению рН готовой среды и может незначительно меняться после стерилизации. Пределы значения рН, указанные выше, учитывают отклонения рН после стерилизации среды.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Специфическая активность: Среда ПАЛ обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-6} (около 100 м.к.) не позднее 48 ч инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на всех засеянных чашках Петри рост тест-штаммов *Listeria monocytogenes* 766 и *Listeria ivanovii* в виде круглых колоний серо-зеленого цвета, с образованием вокруг колоний черной зоны, *L. monocytogenes* 766 – диаметром 1,0-1,6 мм, *L. ivanovii* – диаметром 0,6-1,2 мм.

Ингибирующие свойства. Среда ПАЛ полностью подавляет рост тест-штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19 222 и *Staphylococcus aureus* Wood-46 на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} (10000 м.к.) через 48 ч инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При анализе исследуемого материала необходимо соблюдать требования СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

В состав среды входит литий хлористый, который может вызывать раздражение органов дыхания и рук. Во время работы необходимо использовать индивидуальные средства защиты органов дыхания и рук.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат обеспечивающий температуру $37\pm 1^\circ\text{C}$
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Автоклав
- Пробирки стеклянные
- Пипетки стеклянные позволяющие отбирать объемы жидкости 1 и 2 мл
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Воронки стеклянные

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Объекты исследований - пищевые продукты, корма для животных, вода, объекты внешней среды и др.

Взятие, посев исследуемого материала проводят в соответствии с ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*», ГОСТ ISO 11133-2016 «Микробиология пищевых продуктов кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред», МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах», МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» и другими нормативными документами.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследование проводят в условиях бактериологической лаборатории специалистами-бактериологами, изучившими Инструкцию по применению.

7.1. Приготовление среды ПАЛ

Навеску среды ПАЛ в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии, размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить в течение 3 мин до полного расплавления агара, профильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить в емкости и простерилизовать автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Охладить до 45-50°С.

7.2 Приготовление среды ПАЛ с селективной добавкой

Содержимое флакона с селективной добавкой растворить в 5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать, внести в стерильную, охлажденную среду (из расчета 5 мл/л) и разлить в стерильные чашки Петри. После застывания чашки со средой подсушить.

Готовая среда с СД прозрачная желто-зеленого цвета.

Проведение анализа образцов допускается осуществлять в течение 7 сут после приготовления среды, при условии ее хранения при температуре 2-8 °С.

7.2. Исследуемый материал, подготовленный согласно соответствующим документам, засеять соответственно на чашки Петри со средой ПАЛ и стерильным шпателем распределить взвесь по поверхности среды. Инкубировать до 48 ч при температуре (37±1)°С.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят визуально, учитывая наличие роста в виде круглых колоний, серо-зеленого цвета с образованием вокруг колоний черной зоны.

9. УТИЛИЗАЦИЯ

Серии среды ПАЛ, пришедшие в негодность (нарушение целостности упаковки), а также в связи с истекшим сроком годности, утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 как отходы, принадлежащие к классу «А» - эпидемиологически безопасные отходы, любым способом, предотвращающим повторное использование, например, сжиганием.

Уничтожение среды ПАЛ после проведения биологического контроля осуществляется по СанПиН 2.1.7.2790-10 как отходы, принадлежащие к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 2 ч при температуре (126±1) °С.

Обращение с отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной организации. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ИЗДЕЛИЯ

Среду ПАЛ необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °С. СД хранят при температуре от 2 до 8 °С.

После вскрытия банку со средой хранят до истечения срока годности плотно закрытой, в сухом месте при температуре от 2 до 30 °С, избегая попадания влаги.

Среду ПАЛ транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения, допускается транспортирование при температуре от минус 18 до плюс 40 °С не более 7 суток.

Срок годности среды ПАЛ - 2 года, СД – не менее срока годности среды. Среда с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке использованию не подлежит.

Изготовитель гарантирует соответствие «Питательного агара для выделения листерий сухого (ПАЛ)» заявленным в ТУ 20.59.52--78095326-2018 требованиям и функциональным характеристикам с начала использования в течение всего срока годности и при соблюдении условий хранения и транспортирования.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

По всем вопросам, касающимся качества «Питательного агара для выделения листерий сухого (ПАЛ)», получения консультации и поддержки обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.