

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФБУН
Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии
_____ И.А. Дятлов
« ____ » _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для санитарно-бактериологических исследований «Желточный агар с маннитом и феноловым красным, основа (МҮР агар)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для санитарно-бактериологических исследований «Желточный агар с маннитом и феноловым красным, основа (МҮР агар)» предназначен для выделения и подсчета *Bacillus cereus* из пищевых продуктов, кормов для животных и объектов окружающей среды.

Не является медицинским изделием.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

МҮР агар выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г, селективная добавка (СД)¹ выпускается в стеклянных флаконах по 0,012 г (на одну банку с МҮР агаром - 8 флаконов с СД).

Основа представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный, светочувствительный порошок светло-розового цвета, который получают смешиванием сухих компонентов.

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

2.1. Принцип действия

Питательная среда специально адаптирована под свойства *Bacillus cereus*. *B.cereus* - маннитол-отрицательны. Присутствие маннитола в среде позволяет дифференцировать сопутствующую маннитолположительную микробную флору, идентифицируемую по изменению цвета индикатора фенолового красного на желтый. *B.cereus* устойчивы к концентрациям полимиксина, который подавляет обычную сопутствующую микробную флору. Добавление полимиксина необходимо, если предполагается высокое содержание сопутствующих микроорганизмов в материале проб. *B.cereus* вырабатывают лецитиназу. Нерастворимые продукты деградации яичного желтка аккумулируются вокруг колоний *B.cereus*, образуя белый осадок. Лецитиназная активность проявляется очень быстро у многих штаммов, поэтому колонии *B.cereus* могут быть обнаружены раньше, чем

другие виды устойчивых к полимиксину микроорганизмов имеют возможность полностью развиться.

2.2. Состав

Состав Основы, г/л:

– ПГРМ сухой ПС или ПГК	10,0
– Дрожжевой экстракт	1,0
– D(-) Маннит	0,2
– Натрий хлористый	10,0
– Феноловый красный	0,025
– Натрий углекислый	0-0,3
– Агар бактериологический	10,0±2,0

Состав СД, г/л:

– Полимиксина В сульфат	0,012
-------------------------------	-------

pH от 7,0 до 7,4

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Биологические показатели МУР агара определяют после внесения в основу желточной эмульсии и селективной добавки

3.1 Специфическая активность

МУР агар обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси на всех засеянных чашках Петри через 18-48 ч инкубации при температуре (33±2) °С рост тест-штаммов *Bacillus cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 из разведений 10⁻⁵, а также рост тест-штамма *Staphylococcus aureus* FDA 209-P (ATCC 6538-P) из разведения 10⁻⁶ в виде:

- *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 – шершавые, плоские, матовые колонии розового цвета, окруженные кольцом плотного преципитата, диаметром 3,0 - 6,0 мм;
- *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 - матовые колонии желтоватого цвета с желтой зоной вокруг, диаметром 2,0-3,0 мм;

– *S. aureus* FDA 209-P (ATCC 6538-P) – круглые блестящие колонии желтого цвета с зоной лецитиназной активности диаметром 1,0 - 2,0 мм.

3.2 Ингибирующие свойства

МҮР агар полностью подавляет рост тест-штаммов *Escherichia coli* 168/59 (O111:K58) и *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведений 10^{-4} через 18-48 ч инкубации при температуре (33 ± 2) °С.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат обеспечивающий температуру 33 ± 2 °С
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Автоклав
- Пробирки стеклянные вместимостью – 10 мл
- Пипетки стеклянные позволяющие отбирать объемы жидкости 1 и 2 мл
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Воронки стеклянные

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Объекты исследований - пищевые продукты и другие объекты.

6.2 Взятие, посев исследуемого материала проводят в соответствии с ГОСТ 10444.8-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий *Bacillus cereus*». ГОСТ ISO 21871-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных Метод обнаружения и подсчета наиболее вероятного числа *Bacillus cereus*», ГОСТ 31746-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*», ГОСТ ISO 11133-2016 «Микробиология пищевых продуктов кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред», ГОСТ Р 54354-2011 «Мясо и мясные продукты. Общие требования и методы микробиологического анализа» и другими нормативными документами.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследование проводят в условиях санитарно-бактериологической лаборатории специалистами, изучившими настоящую Инструкцию.

7.1 Приготовление МҮР агара

Навеску Основы в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии, размешивают в 1 л дистиллированной воды. Стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин, охлаждают до температуры 50-45°C и в асептических условиях в основу вносят 25,0 мл стерильной желточной эмульсии (яичный желток 30,0 мл на 70,0 мл стерильного физраствора) и содержимое флакона с селективной добавкой из расчета 5 мл/л (СД растворяют в 5 мл дистиллированной воды при перемешивании в течение 1 мин. Допускается легкая опалесценция). Тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды чашки Петри подсушивают

Готовая питательная среда в чашках Петри непрозрачная, светло-оранжевого цвета.

Готовую среду можно использовать в течение 7 сут. после её приготовления при условии хранения при температуре 2-8 °С.

7.2 Материал, подготовленный согласно действующим документам, инокулируют на чашки Петри. Через 18-48 ч инкубации при температуре (33±2) °С визуально определяют наличие роста.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят визуально. Дальнейшую идентификацию выделенных культур микроорганизмов проводят в соответствии с нормативной документацией.

Для получения достоверных результатов посеvy образцов производить не менее чем в двух повторностях.

9. ТРЕБОВАНИЯ К УТИЛИЗАЦИИ И УНИЧТОЖЕНИЮ

Серии МҮР агара, пришедшие в негодность (нарушение целостности упаковки), а также в связи с истекшим сроком годности, утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 как отходы, принадлежащие к классу «А», любым способом, предотвращающим повторное использование, например, сжиганием.

Уничтожение питательной среды после проведения биологического контроля осуществляется по СП 1.3.2322-08 как отходы, принадлежащие к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 90 мин 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

Основу хранят на складе в герметично закрытой банке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 25 °С. После вскрытия банку со средой хранят до истечения срока годности плотно закрытой, в сухом месте при температуре от 2 до 25 °С, избегая попадания влаги. СД хранят при температуре не выше 25 °С.

Набор реагентов транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 25 °С, допускается транспортировать при температуре от минус 18 до плюс 40 °С не более 7 суток.

Срок годности: 2 года. Среда с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке использованию не подлежит.

Изготовитель гарантирует соответствие Набора реагентов для санитарно-бактериологических исследований «Желточный агар с маннитом и феноловым красным, основа (МҮР агар)» заявленным в ТУ 20.59.52-351-78095326-2021 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 Набора реагентов для санитарно-бактериологических исследований «Желточный агар с маннитом и феноловым красным, основа (МҮР агар)», получения консультации и поддержки обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-10, факс 36-01-20.