

Методы выявления и определения кол-ва Staphylococcus aureus в пищевых продуктах. ГОСТ Р 52815-2007, ГОСТ 7702.2.4-93

Метод основан на выявлении и определении кол-ва *S. aureus* посевом навески или разведения навески продукта в жидкую селективную среду (с предварительным обогащением). Пересеве культуральной жидкости на агаризованные селективно-диагностические среды с последующим подсчетом характерных колоний и подтверждении по биохимическим признакам принадлежности этих колоний к *S. aureus*.

Метод НВЧ *S. aureus* основан на высева навески или разведения навески продукта в жидкую селективную среду, пересеве культуральной жидкости на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды, подтверждении по биохимическим признакам выделенных колоний к *S. aureus*.

Посевы для выявления *S.aureus* в определенной навеске продукта. Первый этап:

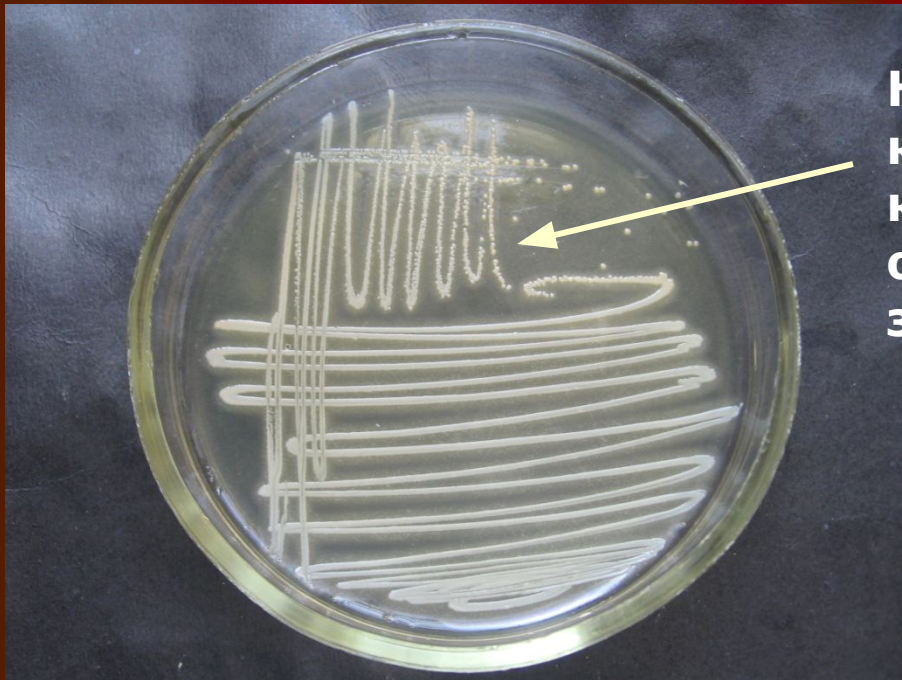


Навеску или разведение навески продукта вносят в солевой (6,5% NaCl) бульон. Соотношение между количеством высеваемого продукта или его эквивалентным разведением и питательной средой 1:6 или 1:7. Посевы инкубируют при $t 36 \pm 1^\circ\text{C}$

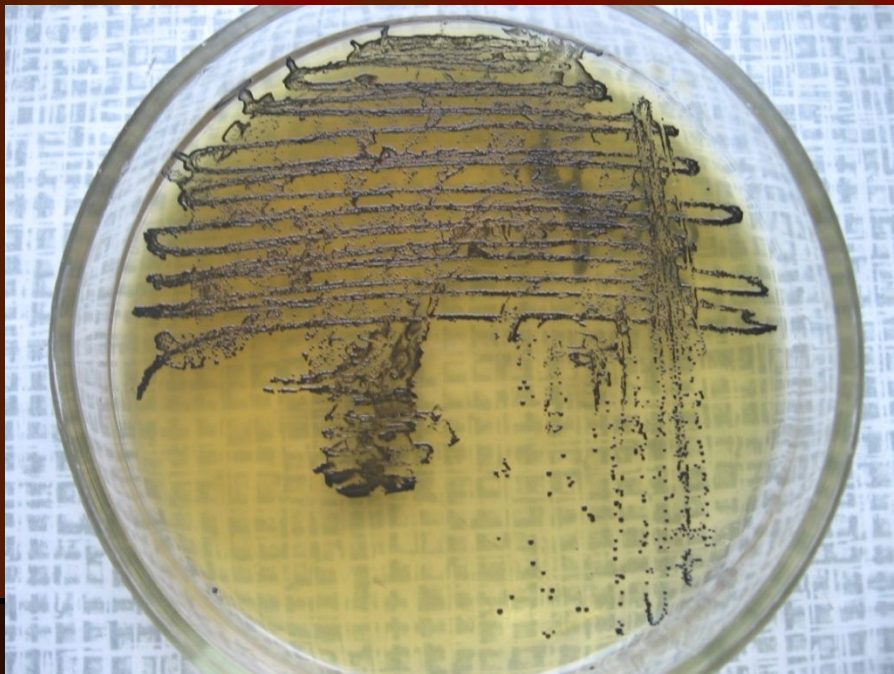
Второй этап: Из жидкой среды после инкубирования делают пересев на поверхность одной из плотных селективно-диагностических сред.

Используют яично-желточно-солевой агар, молочно-солевой агар, Байрд-Паркер агар.

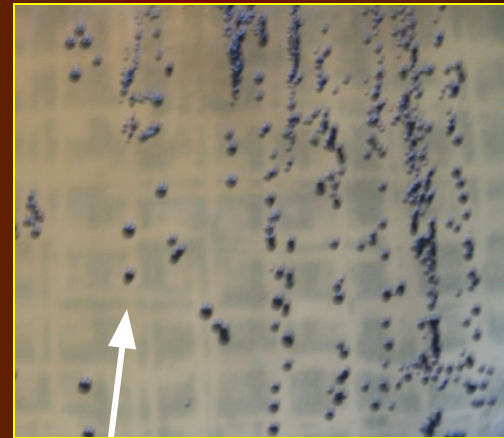




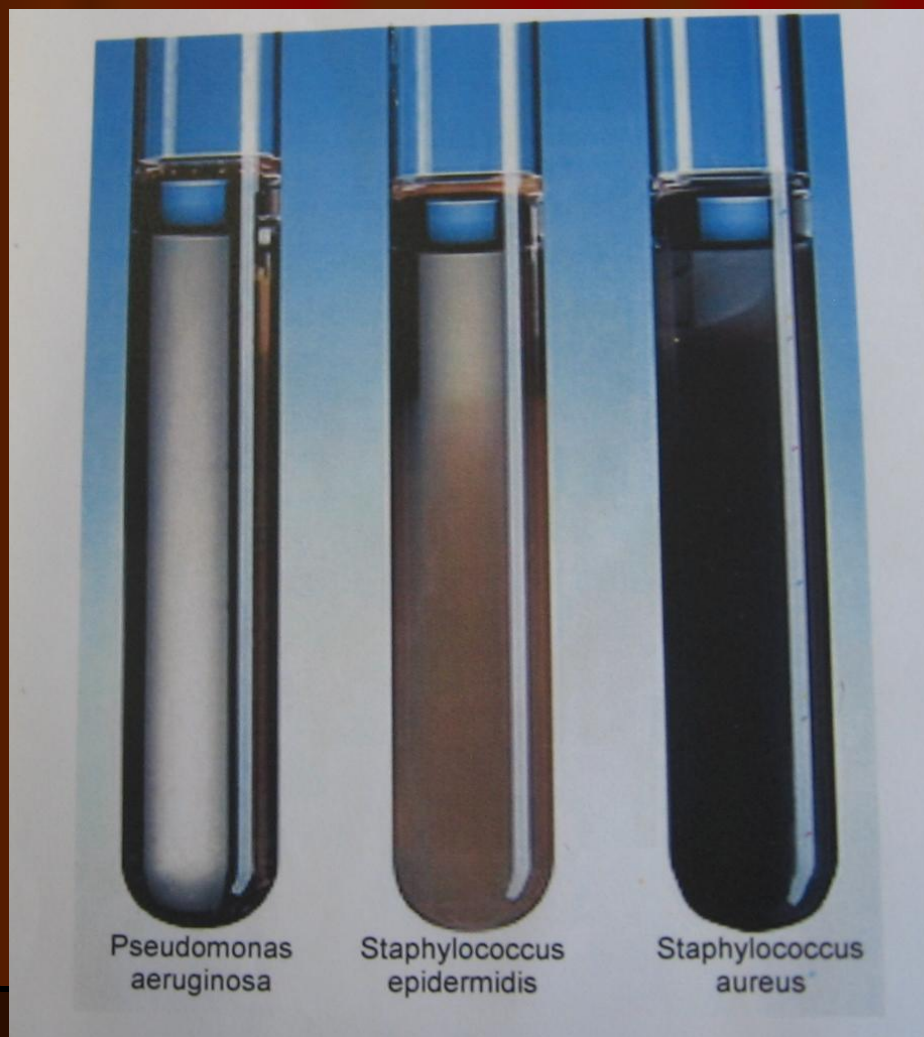
На желточно-солевом агаре колонии *S. aureus* растут в виде колоний кремового или различных оттенков желтого цвета, окружены зоной просветления.



На среде Байрд-Паркера колонии *S. aureus* имеют черный цвет и также окружены зоной просветления.

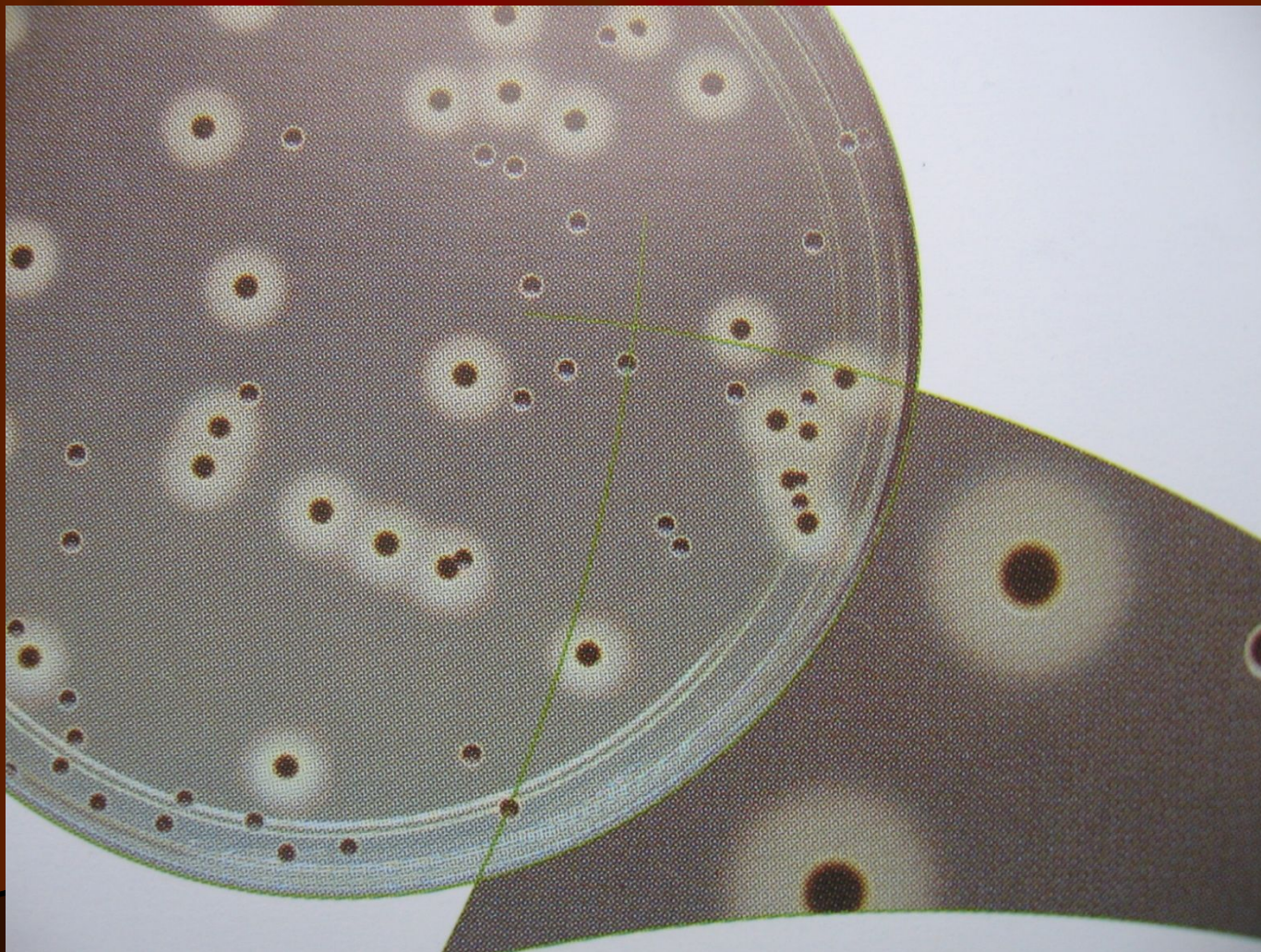


Селективный бульон **Giolitti и Cantoni** (Merck) для выявления стафилококков из пищевой продукции. Стафилококки выявляются по почернению культуральной жидкости вследствие восстановления теллурита калия.



Пируват натрия, глицин, высокая концентрация маннита способствуют росту стафилококков. Грамположительные бактерии подавляются хлоридом лития, грамотрицательные – теллуритом калия. В анаэробных условиях ингибируется рост микрококков.

Агар Baird Parker (с плазмой кролика) - *Staphylococcus aureus* растет в виде черно-серых или черных колоний с зоной просветления. Другие стафилококки (коагулазоотрицательные) зоны просветления не дают.



Третий этап: подтверждение принадлежности характерных колоний к *S. aureus*.

Для подтверждения принадлежности характерных колоний к *S. aureus* отбирают не менее 5 колоний и пересевают на скошенный МПА. После инкубирования при $t\ 36\pm 1^\circ\text{C}$ 24 ч у выросших микроорганизмов определяют отношение к окраске по Граму, способность коагулировать плазму крови кролика, образовывать каталазу и ферментировать мальтозу в анаэробных условиях.

Из культур готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют.

S. aureus положительно окрашиваются по Граму, имеют шарообразную форму, располагаются отдельно или в виде скоплений, напоминающих грозди винограда.

Постановка реакции плазмокоагуляции.

К плазме кролика, приготовленной и разлитой по пробиркам, добавляют по 1 петле испытуемых культур, оставляя 1 пробирку незасеянной в качестве контроля. Пробирки термостатируют при t 36°C в течении 6 ч; если коагуляции не произошло, пробирки оставляют в термостате при t 30°C еще на 24 ч.

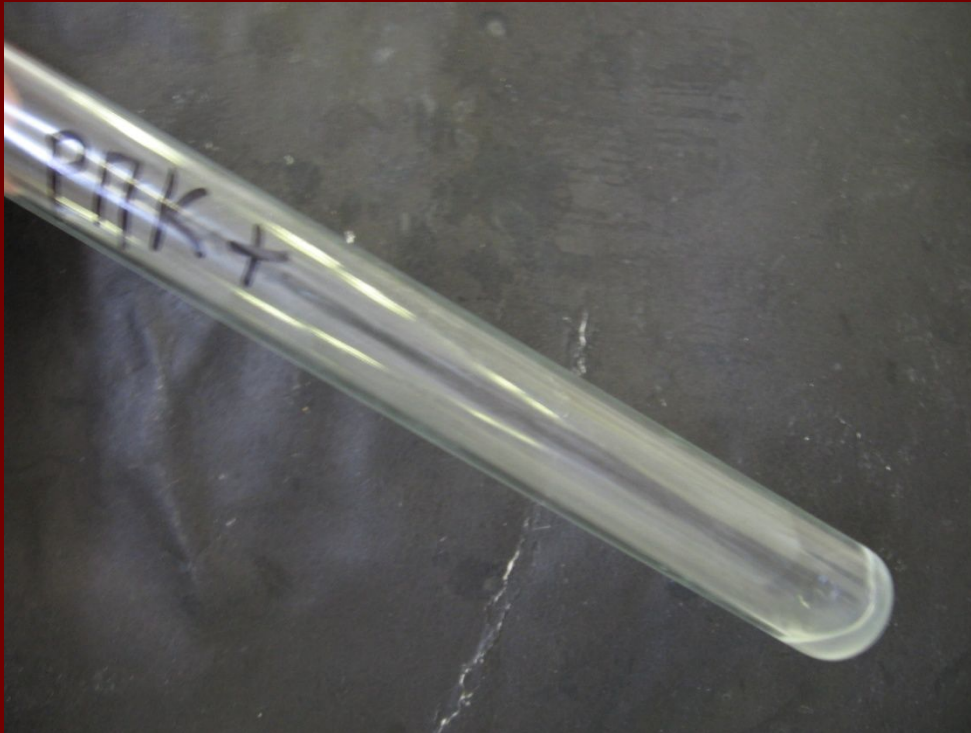
Реакцию оценивают по наличию в пробирке сгустка.



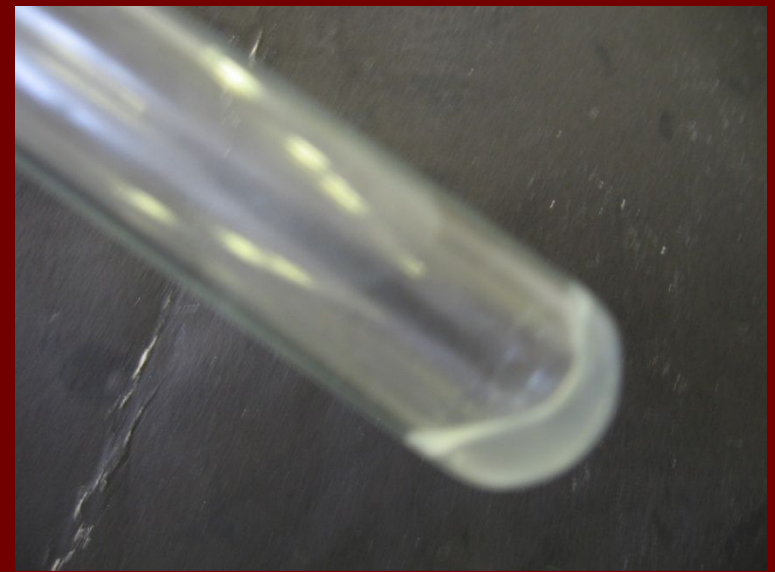
Плазма не свернулась.
Реакция отрицательная



Реакцию плазмокоагуляции оценивают как положительную даже при образовании небольшого компактного сгустка.



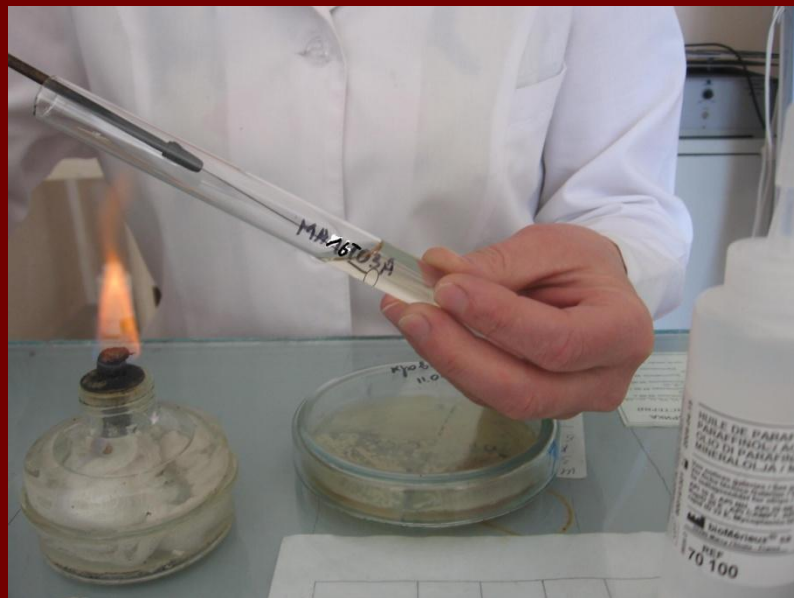
**Плазма свернулась,
реакция положительная**



Способность *S.aureus* ферментировать мальтозу в анаэробных условиях.

Определяют с целью дифференциации *S.aureus* от других коагулазоположительных видов – *S.intermedius* *S. hyicus* subsp.*hyicus*.

Для этого культуры высевают уколом в среду Гисса с мальтозой, на поверхность среды наслаивают голодный агар, высотой 2 см, или в жидкие среды с последующей заливкой среды стерильным вазелиновым маслом. Посевы инкубируют в термостате при $t\ 36^{\circ}\text{C}$ 48 ч. *S.aureus* ферментирует мальтозу в анаэробных условиях – цвет среды меняется.



На предметном стекле в каплю культуральной жидкости добавляют каплю 3% перекиси водорода. Выделение пузырьков газа свидетельствует о каталазной активности. S.aureus обладает каталазной активностью.



Если в посевах обнаружены грамположительные кокки, способные коагулировать плазму кролика, образующие каталазу, ферментирующие мальтозу в анаэробных условиях, то выявленные микроорганизмы относят к S.aureus.

Для биохимической идентификации *S.aureus* допускается пользоваться биохимическими микротестами API Staph. Стрип API Staph состоит из 20 микролунок, содержащих дегидрированные субстраты. Регидратация субстратов происходит при внесении в лунки суспензии изучаемой чистой культуры.

Суспензию культуры готовят плотностью 0,5 ед. по стандарту МакФарланда, или с помощью прибора DENSIMAT. Затем вносят в лунки и инкубируют 18-24 ч при 37°C.



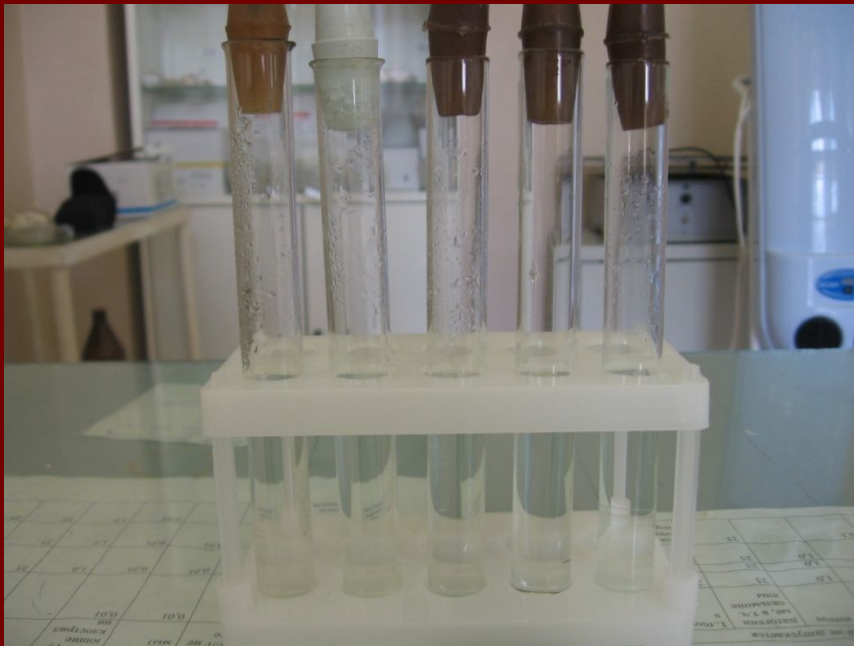
Также допускается использование пластин биохимических, дифференцирующих стафилококки (ПБДС). Это система одноразового использования для дифференциации микроорганизмов рода *Staphilococcus* по биохимическим свойствам.

Изучаемую чистую культуру микроорганизмов закапывают в лунки с субстратом и индикаторами, инкубируют 24 ч при **37°C**, затем учитывают в соответствии с цветной таблицей в приложении

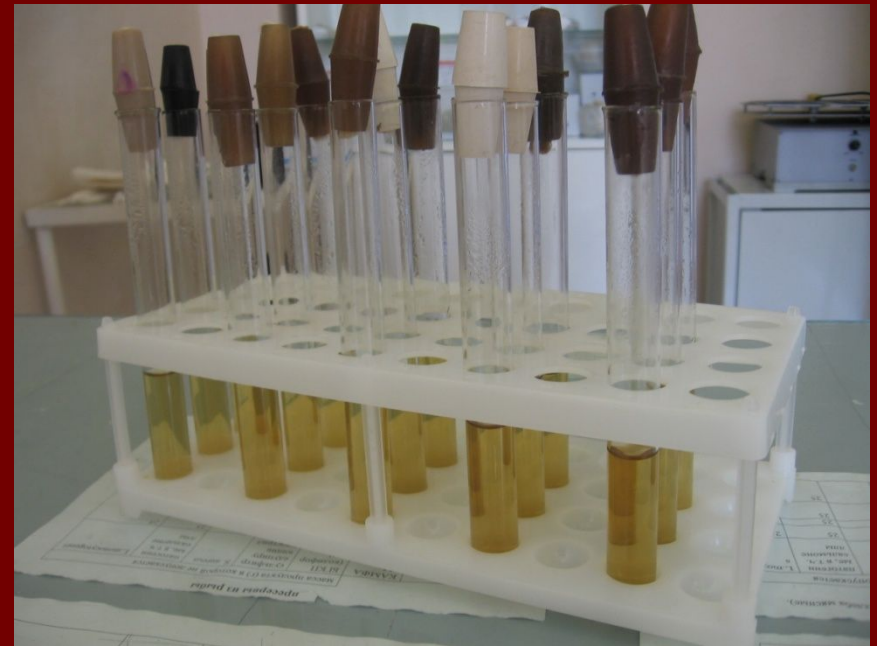


Способ определения кол-ва *S.aureus* посевом в жидкие питательные среды основан на методе НВЧ.

Для этого три последовательных десятикратных разведения высевают в солевой бульон, каждое разведение в трехкратной последовательности.



Ряд десятикратных разведений от 1:10 до 1:100000



Посев из каждого разведения по 1 мл в три пробирки с солевым бульоном.

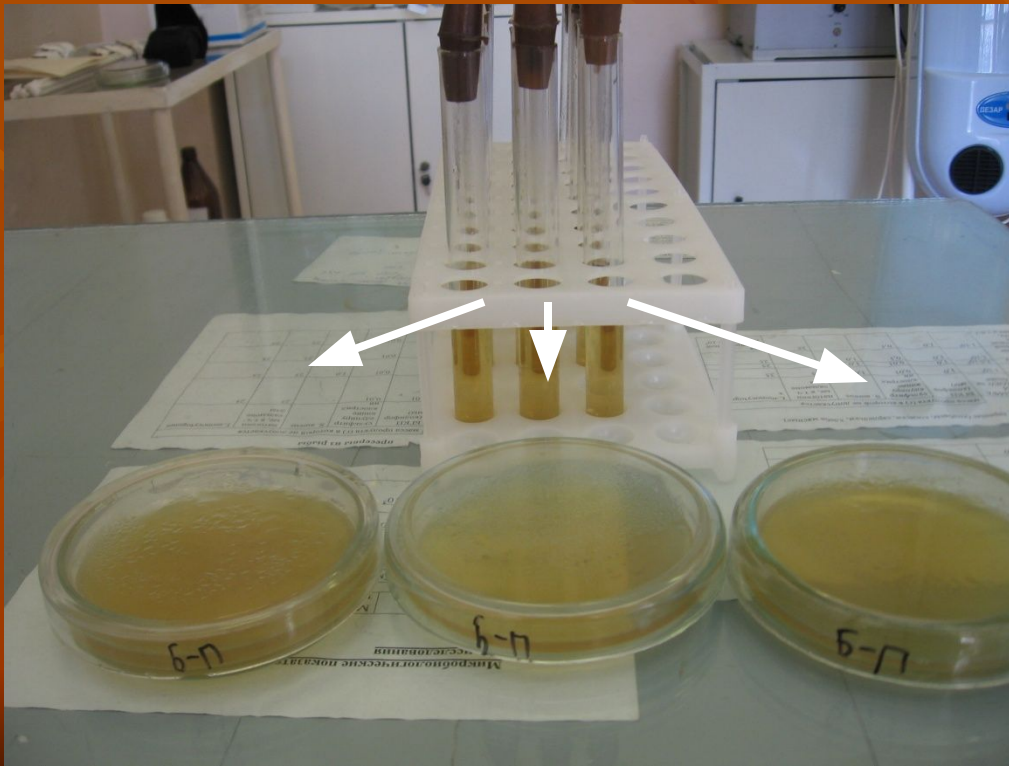
После инкубирования посевов выбирают три самых высоких последовательных разведения, в первом из которых во всех трех пробирках наблюдается рост (ГОСТ 26670-91), а в последнем или последующем не оцениваемом разведении во всех трех пробирках роста не наблюдается. Например 3, 2, 0, или 3, 2, 1, 0.

Если после разведения, в котором все три пробирки были отрицательными, одна из пробирок следующего разведения была положительна (3, 2, 0, 1), то учитывают три наивысших разведения, начиная с того, где кол-во положительных пробирок было меньше трех (2, 0, 1).

Если после разведения с тремя положительными пробирками было посеяно только одно разведение, и в нем оказалась 1 или 2 положительных пробирки (3, 3, 2 или 3, 3, 1), НВЧ микроорганизмов записывают как «более чем» (см. таблицу)

Если все пробирки посеянных разведений окажутся отрицательными, (0, 0, 0), то НВЧ микроорганизмов будет ниже числа, выявляемого посеянными разведениями. Если все пробирки будут положительными (3, 3, 3), то НВЧ микроорганизмов будет выше его максимального значения (см. таблицу). Например, при комбинации 3, 2, 1 НВЧ составляет 150 микроорганизмов в 1 г, если инокулированы разведения 10^{-1} , 10^{-2} , и 10^{-3} . Если учитывали разведения 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} , то результат будет 150×10 микроорганизмов.

Далее проводят исследование культуры, выросшей в положительных пробирках на принадлежность к *S.aureus*, т.е. проводят пересев с солевого бульона на плотные питательные среды, выделение характерных колоний и подтверждении принадлежности этих колоний по биохимическим признакам к *S.aureus* (см. слайды со 2 по 9).



Пересев с солевого бульона на яично- желточно-солевой агар или Агар Байрд-Паркера.