

Постановление от 18 Дху Эль-Хиджа 1426 , что соответствует 18 января 2006 года, касательно назначения членов и секретарей избирательных участков в рамках довыборов с целью замещения избранных членов Совета Нации.

Министр юстиции, хранитель государственных печатей,

Принимая во внимание распоряжение № 97-07 от 27 Шавваля 1417, что соответствует 6 марта 1997 года, с изменениями и дополнениями, касательно основного закона, устанавливающего принципы избирательной системы, в частности его статью 136;

Принимая во внимание президентский указ № 05-161 от 22 Раби Эль-Ауэль 1426, что соответствует 1 мая 2005 года, касательно назначении членов Правительства;

Принимая во внимание президентский указ № 06-01 от 7 Дху Эль-Хиджа 1426, что соответствует 7 января 2006 года, касательно созыва избирательной коллегии в вилайя Беджая, Бешар, Тизи-Узу, Медеа и Оран в рамках довыборов с целью замещения избранных членов Совета Нации;

Принимая во внимание подзаконный декрет № 97-423 от 10 Раджабаа 1418, что соответствует 11 ноября 1997 года, с изменениями и дополнениями, касательно организации и хода выборов избранных членов Совета Нации;

Постановляет:

Статья 1. — На должности председателей, заместителей председателей, заседателей и секретарей избирательных участков в рамках довыборов с целью замещения избранных членов Совета Нации назначаются магистраты и секретари суда, имена которых приведены ниже:

Вилайя Беджая:

- Г-жа и Г-да: Мешури Аберрахман, председатель;
- Маафа Седдик, заместитель председателя;
- Узнаджи Надя, заседатель;
- Аберраазак Мохамед, заседатель;
- Алиуа Хоцин, секретарь

Вилайя Бешар:

- Г-да:
- Уаад Абделькадер, председатель;
- Азаирия Амхамед, заместитель председателя;
- Бетайаб Хебеддин, заседатель;
- Луккаф Мохамед, заседатель;
- Джакани Аббидин, секретарь.

Вилайя Тизи-Узу:

- Г-жи и г-да:
- Риаш Абдельхамид, председатель;
- Базизи Надя, заместитель председателя;
- Айуез Хаддаа, заседатель;
- Махфудхи Хаджира, заседатель;
- Бешуш Саид, секретарь.

Вилайя Медеа:

- Г-да:
- Буассила Мессауд, председатель;

- Бусенна Али, заместитель председателя;
- Ауисси Рашид, заседатель;
- Бенаши Хаким, заседатель;
- Бен Ребайя Зубир, секретарь.

Вилайя Оран:

Г-да:

- Белабиод Ахмед, председатель;
- Хаджири Фуад, заместитель председателя;
- Секка Куидер, заседатель;
- Бен Хамида Абдеррахими, заседатель;
- Бен дида Блаха, секретарь.

Ст. 2. — Настоящее постановление будет опубликовано в Официальном бюллетене Алжирской народно-демократической республики.

Составлено в г. Алжир, 18 Дху Эль-Хиджа 1426, что соответствует 18 января 2006 года.

Тайеб БЕЛАИЗ

МИНИСТЕРСТВО ТОРГОВЛИ

Постановление от 21 Шавваля 1426, что соответствует 25 сентября 2005 года, делающее обязательным метод исследования на наличие *Листерии моноцитогенной* в молоке и молочных продуктах.

Министр торговли,

Принимая во внимание президентский указ № 05-161 от 22 Раби Эль-Ауэль 1426, что соответствует 1 мая 2005 года, касательно назначения членов Правительства;

Принимая во внимание подзаконный декрет № 90-39 от 30 января 1990 года касательно контроля качества и борьбы с экономическими преступлениями;

Принимая во внимание подзаконный декрет № 02-453 от 17 Шавваля 1423, что соответствует 21 декабря 2002 года, устанавливающий должностные полномочия министра торговли;

Принимая во внимание межведомственное постановление от 29 Сафара 1414, что соответствует 18 августа 1993 года, касательно спецификаций и внешних характеристик некоторых видов потребительского молока;

Принимая во внимание постановление от 14 Сафара 1415 года, что соответствует 23 июля 1994 года, с изменениями и дополнениями, касательно спецификаций по микробиологической чистоте некоторых пищевых продуктов;

Постановляет:

Статья 1. — В применение положений статья 19 упомянутого выше подзаконного декрета № 90-39 от 30 января 1990, с изменениями и дополнениями, настоящее постановление имеет целью сделать обязательным метод исследования на наличие *Листерии моноцитогенной* в молоке и молочных продуктах.

Ст. 2. — В целях исследования на наличие *Листерии моноцитогенной* в молоке и молочных продуктах, лаборатории по контролю качества и по борьбе с экономическими преступлениями, а также лаборатории, сертифицированные в этих целях, должны

использовать метод микробиологического анализа, описанный в приложении.

Данный метод должен также использоваться лабораторией, если выдано предписание о проведении экспертизы.

Ст. 3. — Настоящее постановление будет опубликовано в Официальном бюллетене Алжирской народно-демократической республики.

Составлено в г. Алжир, 21 Шавваля 1426, что соответствует 25 сентября 2005 года.

Лахеми ДЖААБУБ

ПРИЛОЖЕНИЕ

МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ *ЛИСТЕРИИ МОНОЦИТОГЕННОЙ* В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

1. Определения

Для целей настоящего метода применяются приведенные ниже определения.

1.1 *Listeria spp*:

Микроорганизмы, образующие типичные колонии в твердой избирательной среде и обладающие описанными морфологическими, физиологическими и биохимическими характеристиками, если испытания проводятся в соответствии с настоящей методикой.

Листерия моноцитогенная (Listeria monocytogenes)

Типовой вид патогенной *Листерии*, который может быть дифференцирован от прочих видов, так как он имеет специфические биохимические характеристики.

1.3 Обнаружение *Листерии моноцитогенной*

Определение присутствия или отсутствия данного микроорганизма, с определением по массе или по объему, если испытания проводятся в соответствии с настоящей методикой.

2. Принцип

В общем, обнаружение *Листерии моноцитогенной* требует как минимум четыре последовательных этапа, как таковые описаны в пунктах с (2.1) по (2.4). И как таковое также проиллюстрировано следующим ниже схематическим представлением порядка проведения испытания:

Рисунок 1

Схематическое представление
порядка проведения испытания



Первичное обогащение (25 г или 25 мл в 225 мл
в среде Фрейзера из расчета 1/2)

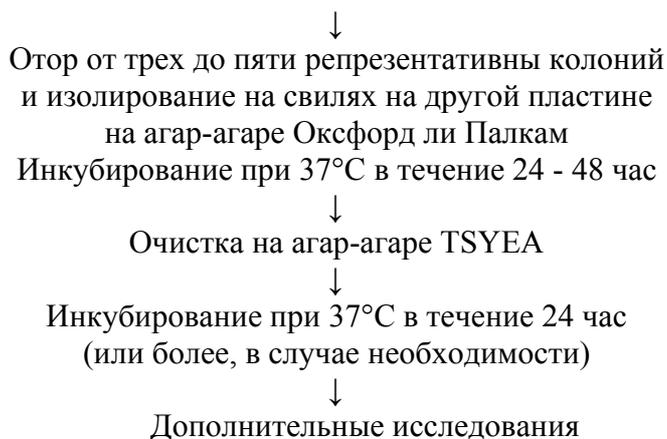
Инкубирование при 30°C в течение 18 - 24 час



Вторичное обсеменение 0,1 мл в среде Фрейзера
в пробирках объемом 10 мл, и

Изолирование на свиялях на агар-агаре Оксфорд ли Палкам

Инкубирование при 37°C в течение 24 - 48 час



2.1 Первичное обогащение в жидкой избирательной среде

Взятие на испытание образца весом 25 г или объемом 25 мл в избирательной среде Фрейзера наполовину. Инкубирование при 30°C в течение 18 - 24 час

2.2 Вторичное обогащение и первичное изолирование.

После инкубационного периода среды (2.1) выполнить:

* с одной стороны, вторичное обогащение в бульоне Фрейзера в мензурках в количестве 0,1 мл раствора, полученного от (2.1), инкубировать при 37°C в течение 24 час,

* и с другой стороны, первичная изоляция в свиялях на пластине с агар-агаром Оксфорд или Палкам. Инкубация должна проводиться при 37°C в течение 24 - 48 часов.

2.3 Подтверждение

После инкубационного периода среды (2.2) выполнить:

* с одной стороны, вторичная изоляция в свиялях на пластине с агар-агаром Оксфорд или Палкам, на основе бульона вторичного обогащения. Инкубация должна проводиться при 37°C в течение 24 - 48 часов.

* * и с другой стороны, считывание пластин с агар-агаром Оксфорд или Палкам. Изучить репрезентативные колонии, и повторно засеять от трех до пяти из них на среду TSYEA в целях очищения. Инкубирование пластин с агар-агаром TSYEA должно осуществляться при 37°C в течение 24 - 48 часов.

2.4 Биохимическая идентификация

После периода инкубации ,выполнить сначала:

* идентификацию вида *Листерии*, основываясь на морфологическом аспекте колоний, на окрашивании по Граму и на реакции Каталазы,

* затем идентификацию вида *Листерии моноцитогенной*, основываясь главным образом на гидролизе эскулина, на подвижности при 22-25°C, на реакциях (Vauges Prauskawer VP) и с метиловым красным, на гемолизе или Camp-Тесте, на ферментации глюкозы без газа, на дыхательном типе.

3. Культурные среды и реактивы

3.1 Культурные среды

3.1.1 Бульон первичного обогащения: базовая среда.

Состав:

Протеазный пептон.....	5,0 г
Триптон	5,0 г
Говяжий экстракт.....	5,0 г
Экстракт дрожжей.....	5,0 г
Хлорид натрия.....	20,0 г
Гидрофосфат натрия....	12,0 г
Дигидроортофосфат калия	1,35 г
Эскулин.....	1,0 г
Хлористый литий.....	3,0 г
Вода.....	1000 мл

Приготовление:

Растворить компоненты в воде, затем умеренно нагреть вплоть до полного растворения. Довести уровень рН до 7,2.

Затем распределить среду в количестве:

- 225 мл на флакон, которые будут использоваться для первичного обогащения;
- 10 мл на пробирку, которые будут использоваться для вторичного обогащения.

Затем стерилизовать среду при 121 °С в течение 15 минут.

3.1.2 Избирательная добавка для Бульона Фрейзера

В момент использования половинного бульона Фрейзера, также как и полного бульона Фрейзера, к ним должна добавляться их добавка, имеющая следующий состав:

Налидиксовая кислота.....	22,5 мг
Акрифлавин.....	28,125 мг
Цитрат Железа (III) аммиачный	1,125 мг

Довести в стерильных условиях флакон с добавкой до 22.5 мл с помощью стерильной смеси 1/1 вода/этанол (т.е. 11,25 мл стерильной дистиллированной воды и 11,25 мл этанола).

Аккуратно перемешать до растворения.

Затем добавить в асептических условиях:

- * 2,25 мл приготовленного таким образом раствора, в 225 мл половинного бульона Фрейзера;
- * 0,10 мл приготовленного таким образом раствора, в 10 мл бульона Фрейзера.

Тщательно перемешать перед введением жидкого посевного материала.

После восстановления, добавка должна храниться при + 4°С, в защищённом от света месте, срок хранения не должен превышать 8 дней.

3.1.3. Среда изолирования (агар-агар Оксфорд) базовая среда

Состав:

Агар-агар Колумбия	39 г
Эскулин	1 г
Цитрат железа (3+) аммиачный	0,5 г
Хлорид лития	15 г
Вода	1000 мл

Приготовление

Растворить компоненты в воде, затем умеренно нагреть вплоть до полного растворения. Довести уровень рН до 7,2 при 25°C. Затем распределить среду в объеме 225 мл на флакон, затем стерилизовать при 121°C в течение 15 минут.

3.1.4 Избирательная добавка для агар-агара Оксфорд.

Состав:

Циклогексимид.....	200 мг
Колистин сульфат.....	10 мг
Акрифлавин.....	2,5 мг
Цефотетан.....	1 мг
Фосфомицин.....	5 мг
Этанол	2,5 мл
Вода.....	2,5 мл

Приготовление:

Растворить твердые ингредиенты в смеси этанол/ вода. Стерилизовать посредством фильтрации.

В момент использования, расплавить среду, затем охладить ее до температуры порядка 48°C. Затем добавить 2,25 мл восстановленной избирательной добавки Оксфорд.

Гомогенизировать и разлить по стерильным чашкам Петри.

Дать застыть на химическом столе, затем высушить в сушильном шкафу.

Приготовленные таким образом чашки могут также храниться при +4°C в течение 4 - 5 дней.

3.1.5. Среда изолирования (агаар-агар Палкам) базовая среда Состав:

Пептон.....	23,0 г
Амидон.....	1,0 г
Агар-агар.....	20,0 г
Хлористый натрий.....	5,0 г
Маннитол	10,0 г
Цитрат железа(III)-аммония.....	0,5 г
Эскулин	0,8 г
Глюкоза.....	0,5 г
Хлорид лития.....	15,0 г
Феноловый красный.....	0,08 г
Вода.....	1000 мл

Растворить компоненты в воде, затем умеренно нагреть вплоть до полного растворения. Довести уровень рН до 7.2 при 25°C. Затем распределить среду в объеме 225 мл на флакон, затем стерилизовать при 121°C в течение 15 минут.

Приготовление:

В момент использования, расплавить среду, затем охладить ее до температуры порядка 48°C. Затем добавить 2,25 мл восстановленной избирательной добавки Палкам

Гомогенизировать и разлить по стерильным чашкам Петри.

Дать застыть на химическом столе, затем высушить в сушильном шкафу.

Приготовленные таким образом чашки могут также храниться при +4°C в течение 4 - 5 дней.

3.1.6 Культурная среда с агаром: Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) Состав:

Триптон-соевый агар	30,0 г
Экстракт дрожжевой.....	6,0г
Агар-Агар (1).....	от 9 до 18,0 г
Вода.....	1000 мл
Ферментативный сброженный органический осадок казеиновый	17,0 г
Ферментативный сброженный органический осадок соевой муки	3,0 г
Хлорид натрия.....	5,0г
Гидрогенфосфат двукалийевый.....	2,5г
Глюкоза	2,5 г

Растворить компоненты в воде, затем умеренно нагреть вплоть до полного растворения. Довести уровень рН до 7.2 при 25°C. Затем распределить среду в объеме 225 мл на флакон, затем стерилизовать при 121°C в течение 15 минут.

В момент использования, расплавить среду, затем охладить ее до температуры порядка 48°C. Разлить по чашкам Петри, дать застыть на химическом столе, затем высушить в сушильном шкафу.

Приготовленные таким образом чашки могут также храниться при +4°C в течение 4 - 5 дней.

(1) в зависимости от способности к гелеобразованию Агар-Агара

3.1.7 Кровяной агар

Основа кровяного агара п2.....	40 г
Вода.....	1000 мл

Состав:

Протеазный пептон.....	15,0 г
Дигестат печени.....	2,5 г
Экстракт дрожжевой.....	5,0г
Хлорид натрия.....	5,0г

Анар-агар (в зависимости от способности к гелеобразованию агара) от 12 до 18 г

Приготовление

— Растворить в воде обезвоженную основу кровяного агара, доведя ее до кипения.
— При необходимости, отрегулировать уровень рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,0 при 25° С.

— Распределить основу по флаконам с максимальным объемом 500 мл.

— Стерилизовать в автоклаве (4.1.1.2), настроенном на 121 °С, в течение 15 минут.

— Охладить среду до 45 °С. Добавить дефибрированную кровь и тщательно перемешать.

— Распределить среду количествами примерно по 20 мл в стерильные чашки Петри и дать застыть.

3.1.8. Основа

Протеазный пептон.....	10,0 г
Говяжий экстракт.....	1,0 г
Хлорид натрия.....	5,0 г
Бромокрезоловый пурпуровый краситель	0,02 г
Вода.....	1000 мл

3.1.8.1 Приготовление

- Растворить компоненты в воде, доведя до кипения.
- При необходимости, отрегулировать уровень рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 6,8 при 25° С.
- Разлить по пробиркам в таких количествах, чтобы после этого осталось 9 мл.
- Стерилизовать в автоклаве (4.1.1.2), настроенном на 121 °С, в течение 20 минут.

3.1.8.2 Углеводные растворы

Состав:

Углевод	5 г
Вода.....	100 мл

Приготовление

Растворить отдельно каждый углевод.

3.1.8.3 Полная среда

Для каждого из углеводов, добавить в асептических условиях 1 мл раствора (3.1.8.2) к 9 мл основной среды (3.1.8.1).

Если были приготовлены меньшие объемы базовой среды, тогда добавить также небольшие объемы раствора углевода.

- (1) Состав основы из кровяного агара № 2.
- (2) Необходимо 100 мл раствора L-раминозы и 100 мл раствора D-ксилозы.

3.1.9 Полдвижная среда

Состав:

Пептон казеина.....	20,0 г
Мясной пептон.....	6,1 г
Агар-агар.....	3,5 г
Вода.....	1000 мл

Приготовление

- Растворить компоненты в воде, доведя до кипения.
- При необходимости, отрегулировать уровень рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,3 при 25° С.
- Разлить по пробиркам в количествах примерно по 5 мл.
- Стерилизовать в автоклаве (4.1.1.2), настроенном на 121 °С, в течение 15 минут.

3.1.10 Тест КАМП (Кристи, Аткинс, Мунк-Петерсен)

Чашки с кровавым агаром (3.1.7) могут использоваться для данного теста, однако, предпочтительно использовать чашки Петри с тремя тонкими слоями кровавого агара на крови барана (3.1.10.3).

3.1.10.1 Основа

Состав:

Основа кровавого агара № 2 (смотри 3.1.7) 40 г

Вода..... 1000 мл

Приготовление

- Растворить в воде обезвоженную основу кровавого агара, доведя ее до кипения.
- При необходимости, отрегулировать уровень рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,0 при 25° С.
- Разлить по пробиркам или по флаконам в количествах по 100 мл.
- Стерилизовать в автоклаве (4.1.1.2), настроенном на 121 °С, в течение 15 минут. Дать остыть до 45° С.

3.1.10.2 Кровавой агар Состав:

Базовый слой (3.1.10.1)..... 100 мл

Конская или баранья дефибрированная кровь 7 мл

Приготовление

Добавить дефибрированную кровь в расплавленную и стерилизованную основу (3.1.10.1).

3.1.10.3 Полная среда

(3.1.10.1) Разлить основу (3.1.8.1) по стерильным чашкам Петри количествами примерно по 10 мл и дать застыть. Налить очень тонкий слой кровавого агара (3.1.10.1), используя количества, не превышающие 3 мл на чашку.

— Дать застыть ровным слоем. Если кровь добавляется в чашки, содержащие заранее приготовленную основу, перед наливом кровавого слоя может оказаться необходимым провести нагрев чашек в течение 20 минут, поместив их в сушильный шкаф, настроенный на 37°С.

— Высушить чашки перед использованием.

3.1.10.4 Реакционные среды КАМП

Штамм, слабо β-гемолитический *Золотистого стафилококка* (например, NCTC 1803) и штамм *Rhodococcus equi* (например, NCTC 1621) необходимы для проведения теста КАМП. Все штаммы *Золотистого стафилококка* непригодны для теста КАМП.

— Хранить культуры *S. aureus*, *R. equi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* и *L. ivanovii*, засеяв наклонные пробирки TSYEA (3.1.6), и инкубируя при 37°С в течение 24 час - 48 час, или до того, как будет обнаружен рост, и хранить их в холодильнике (4.1.10) при 4°С.

— Повторно высевать культуры, как минимум 1 раз в месяц.

3.2 Реактив- Раствор перекиси водорода, 3% (об/об)

4. Аппаратура и лабораторная посуда

Стерилизовать все приборы, которые будут контактировать с культурными средами,

с жидкостью растворов или с образцами, если только речь не идет об аппаратах, поставленных в стерильных условиях (в частности, приборы из пластика).

4.1 Аппаратура

Стандартное оборудование микробиологической лаборатории и, в частности, как показано ниже.

4.1.1 Аппараты для стерилизации сухим жаром (печь) или влажным жаром (автоклав).

4.1.1.1 Печь, настраиваемая на $173^{\circ}\text{C} \pm 3$.

4.1.1.2 Автоклав, настраиваемый на $121^{\circ}\text{C} \pm 1$.

4.1.2. Сушильный шкаф, настраиваемый на $30^{\circ}\text{C} \pm 1$.

4.1.3 Сушильный шкаф, настраиваемый на $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.

4.1.4 Сушильный шкаф, настраиваемый на $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

4.1.5 Водяные бани, настраиваемые на $45^{\circ}\text{C} \pm 1$ или на $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.

4.1.6 Аппаратура для гомогенизации

Использовать один из указанных ниже приборов:

а) гомогенизатор ротационный, частота вращения которого находится в диапазоне от 8000 оборотов/минуту до 45000 оборотов/минуту, с чашами из стекла или металла, оснащенными крышками, устойчивыми к условиям стерилизации; или

б) гомогенизатор перистальтического типа (гомогенизатор *Stomacher*), со стерильными мешками из пластика.

Чаши или мешки из пластика должны иметь достаточную вместимость, чтобы обеспечивать возможность корректного смешивания анализируемого образца с подходящими количествами растворителя. Как правило, объем емкости должен равняться двойному объему анализируемого образца с добавленным растворителем.

4.1.7 Петли для инокуляции, из платины /иридия или из никель-хрома, или из пластика, диаметром примерно 3 мм.

4.1.8 Нить для высеивания, из платины /иридия, из никель-хрома или из пластика.

4.1.9 рН-метр с температурной компенсацией для измерения уровня рН приготовленных сред и реактивов, точность $\pm 0,1$ единицы рН при 25°C .

4.1.10 Холодильник для хранения приготовленных сред и реактивов, который может функционировать при температуре от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+5^{\circ}\text{C}$.

4.1.11 Лампа искусственного белого света

4.1.12 Зеркало, плоское или вогнутое.

4.1.13 Тренога, для освещения чашек Петри.

4.1.14 Фазово-контрастный микроскоп, с объективом иммерсионного типа.

4.2 Лабораторная посуда

Лабораторная посуда должна выдерживать повторяющиеся процедуры стерилизации.

4.2.1 Флаконы для культур, для стерилизации и хранения культурных сред и для инкубации жидких сред.

4.2.2 Пробирки для культур, диаметром 16 мм и длиной 125 мм. (Могут использоваться пробирки с металлической крышкой).

4.2.3 Градуированные пробирки, для приготовления полных сред.

4.2.4 Градуированные пипетки емкостью 25 мл, 10 мл и 1 мл, проградуированные соответственно с шагом 0,5 мл, 0,5 мл и 0,1 мл.

4.2.5 Стерильные чашки Петри.

4.2.6 Предметные стекла для микроскопа.

4.2.7 Стеклянные шары.

5. Отбор проб

Важно, чтобы лаборатория получила реально репрезентативный образец, не поврежденный или не подвергшийся изменению в ходе транспортировки или хранения.

Необходимо следовать инструкциям в отношении отбора проб для микробиологических целей.

6. Приготовление пробы

6.1 Молоко

Тщательно взболтать образец, чтобы обеспечить максимально однородное распределение микроорганизмов, вращая быстро 25 раз емкость, содержащую образец. Следует избегать образования пены или же необходимо дождаться ее исчезновения, если она всё же образовалась. Временной интервал между смешиванием и отбором анализируемого образца не должен превышать 3 минуты.

6.2 Сухое молоко, сухая молочная сыворотка, сухая пахта, лактоза, казеин, казеинат

Тщательно перемешать содержимое закрытой емкости, встряхнув несколько раз и вращая вручную. Если емкость слишком заполнена, чтобы можно было обеспечить хорошее перемешивание, перелить содержимое в емкость большего объема, затем перемешать.

6.3 Сливочное масло

Расплавить образец в стерильной емкости на водяной бане (4.1.5), поддерживая температуру 45° С. Перемешивать во время плавления и немедленно извлечь емкость из водяной бани, как только образец полностью расплавится.

6.4 Сыр

Как правило, образец для лаборатории может состоять из массы и из корочки. Порции сыра, образующие образец для испытания, должны быть согласованы и одобрены всеми заинтересованными сторонами.

Выполнить операции, как описано в пункте (7.1.5).

6.5 Мороженое

Выполнить процедуру, как в случае сливочного масла (6.3), однако, необходимо использовать водяную баню (4.1.5), температура в которой поддерживается на уровне 37°С, причем запрещается превышать эту температуру.

6.6 Сброженное молоко, йогурты, сливки десерты

Тщательно перемешать содержимое закрытой емкости, встряхнув несколько раз и вращая вручную, или же открыть емкость и перемешивать содержимое в асептических условиях, используя стерильную лопаточку или ложку.

7. Порядок проведения испытания

7.1 Обсеменение среды обогащения

В целях исследования более одного анализируемого образца в 25 г определенной партии молока или молочного продукта, и чтобы можно было доказать, что группирование (объединение различных анализируемых образцов) не отразится негативным образом на результате исследования молока или молочных продуктов, анализируемые образцы могут быть объединены. Например, если необходимо исследовать 10 навесок по 25 г, можно будет объединить 10 единиц для образования одного единственного анализируемого образца в 250 г и растворить его или же смешать его в 2,25 л среды обогащения.

Добавить анализируемый образец в среду обогащения (3.1.1), как описано в пунктах (7.1.1) - (7.1.7).

7.1.1 Молоко

Добавить 25 мл навески в 225 мл среды обогащения (3.1.1) и перемешать.

7.1.2 Сухое молоко, сухая молочная сыворотка, сухая пахта, лактоза, казеин, казеинат

Взвесить в асептических условиях 25 г образца для испытаний во флаконе закрытом пробкой, содержащем 225 мл среды обогащения (3.1.1). Растворить, помешивая.

7.1.3 Казеин

— Взвесить в асептических условиях 25 г образца для испытаний в стерильной емкости гомогенизатора (4.1.6) и добавить 225 мл среды обогащения (3.1.1) при 45°C.

— Тщательно растворить навеску посредством гомогенизации (от 1 минуты до 3 минут).

7.1.4 Сливочное масло

Взболтать расплавленный образец для испытаний, затем с помощью пипетки, нагретой примерно до 45°C, перенести 25 мл в флакон, содержащий 225 мл среды обогащения

(3.1.1) . Тщательно перемешать.

7.1.5 Сыр

— Взвесить 25 г образца для испытаний в стерильной емкости гомогенизатора, (4.1.6).

— Добавить 225 мл среды обогащения (3.1.1), предварительно разогретой до температуры около 37°C. Тщательно перемешать навеску посредством гомогенизации.

7.1.6 Замороженные молочные продукты (включая мороженое)

При помощи пипетки перенести 25 г расплавленного образца для испытаний во флакон, содержащий 225 мл среды обогащения 2.1) и смешать.

7.1.7 Сброженное молоко, йогурты, сливки десерты

— Взвесить в асептических условиях 25 г образца для испытаний во флаконе закрытом пробкой, содержащем стеклянные шарики (4.2.7) и 225 мл среды обогащения (3.1.1)..

— Смешать, встряхивая.

Если исследуются образцы с низким уровнем рН, проверить в асептических условиях уровень рН взвеси, используя цветную индикаторную бумагу и, при необходимости, довести уровень рН до $7,0 \pm 0,5$ при 25°C .

7.2 Инкубация

Инкубировать засеянную среду обогащения в течение 48 часов в сушильном шкафу (4.1.2), настроенном на 30°C .

7.3 Изолирование и стандартная идентификация

7.3.1 Засеять в свили с помощью петли (4.1.7), из среды обогащения, поверхность чашки с агар-агаром Оксфорд (3.1.3), в целях получения хорошо изолированных колоний.

7.3.2 Вернуть чашку и поместить ее в сушильный шкаф (4.1.3), настроенный на 37°C , на 48 часов.

7.3.3 Исследовать чашку, чтобы проверить наличие репрезентативных колоний *Listeria spp.* (колонии, окруженные ореолом темно-коричневого или черного цвета).

7.4 Подтверждение

7.4.1 Отбор колоний для подтверждения

Из каждой чашки со средой изолирования (агар-агар Оксфорд), (3.1.3), отобрать пять типичных или подозрительных колоний, если имеется менее пяти колоний, отобрать все колонии для подтверждения.

7.4.2 Инкубация

Засеять отобранные колонии в свили на поверхности чашек (TSYEA) (7.3.2) таким образом, чтобы обеспечить надлежащий рост хорошо изолированных колоний. Поместить чашки в сушильный шкаф (4.1.3), настроенный на 37°C , на 24 часа или до того момента, как рост станет удовлетворительным.

Толщина среды с агар-агаром (15 мл/чашка) является важным условием для надлежащего освещения по Генри (смотри ниже).

Исследовать чашки с помощью пучка белого света (4.1.11), достаточно мощного для надлежащего освещения чашек и направленного таким образом, чтобы осветить дно чашки под углом в 45° (смотри рисунок 2).

Если исследуют в этом свете с косым освещением (освещение по Генри), рассматривая верх чашки, то колонии *Listeria spp.* будут иметь синий цвет, и будут давать зернистую поверхность.

Если в чашках (TSYEA) нет больших хорошо изолированных репрезентативных колоний, то необходимо заново засеять в свили колонию и произвести процедуру, описанную выше.

7.4.3 Реакция с каталазой

Отобрать типичную колонию и суспендировать ее на предметном стекле в капле 3%

раствора перекиси водорода (3.2).

Наличие *Listeria* spp. положительных в каталазе подтверждается фактом образования пузырьков газа.

7.4.4 Морфология и характеристики окрашивания

7.4.4.1 Приготовить культуру в среде (TSYEA) (3.1.6), соответствующую типичной колонии, используемой в гемолитической реакции (7.4.5).

Выбрать типичную колонию и суспендировать ее в пробирке, содержащей среду TSYEA. Инкубировать в сушильном шкафу (4.1.4), настроенном на диапазон от 20°C до 25°C, до появления сильного помутнения (от 8 час до 24 час).

Изучение чашек на предмет выявления подозрительных колоний

Провести влажное приготовление, используя петлю, заполненную инкубированной культурой, и исследовать препарат под микроскопом (4.1.4). Микроорганизмы *Listeria* spp. обнаруживаются в форме тонких коротких палочек, имеющих медленную подвижность на повороте.

Культуры, развившиеся при температуре выше 25°C, могут не показывать такую подвижность. Необходимо всегда проводить сравнение с известной культурой. Кокки, большие палочки или палочки, показывающие быструю подвижность, не относятся к *Listeria* spp.

Дополнительное контрольное испытание на подвижность может проводиться при засеивании, с применением петли для засеивания (4.1.8), в среде подвижности (3.1.9) с проколами в культуре, отобранной на основе типичной колонии (TSYEA) (7.4.2) и с инкубацией в сушильном шкафу (4.1.4), настроенном на 25°C, в течение 48 час.

— Изучить рост вокруг точек прокола. Микроорганизмы *Listeria* spp. подвижные и воспроизводят типовой шаблон роста в тени.

В случае отрицательного результата, инкубировать в течение дополнительных 5 дней и заново исследовать проколы.

7.4.4.2 Провести испытание на типовой колонии на среде (TSYEA) (7.4.2) в целях контроля в рамках окраски бактерий по граму. *Listeria* spp. являются грамположительными микроорганизмами.

7.4.5 Гемолиз

— Если морфологические и физиологические характеристики, а также реакция с каталазой показывают наличие *Listeria* spp., засеять чашки с кровяным агаром (3.1.7), чтобы определить гемолитическую реакцию.

— Тщательно высушить поверхность агара перед использованием. Нанести сетку на дне чашки, чтобы выполнить сеть с интервалом 20 - 25 сред на чашку.

— Взять типовую колонию из чашки (TSYEA) и инокулировать пространство для каждой культуры, используя петлю для засеивания (4.1.8).

— Проколоть одновременно контрольные положительные и отрицательные культуры (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* и *L. innocua*).

После инкубирования при 37°C в течение 48 h час в сушильном шкафу (4.1.3), исследовать испытываемые штаммы и контрольные культуры.

— *L. monocytogenes* показывают светлые зоны, узкие и легкие (1-гемолиз); *L. innocua* не должны показывать какую-либо светлую зону вокруг прокола.

— *L. ivanovii* обычно показывают широкие и хорошо отграниченные зоны β-гемолиза. Держать чашки под ярким светом для сравнения испытуемых культур с контрольными культурами.

7.4.6 Биохимическое подтверждение

Для этих тестов, использовать культуру в TSYEA (7.4.4.1).

7.4.6.1 Использование углевода

— Засеять каждый из углеводных ферментационных бульонов (3.1.8.2) содержимым петли или 0,1 мл культуры (TSYEA) (7.4.6).

— Инкубировать при 37°C в сушильном шкафу (4.1.3) в течение 7 часов.

В любом случае, положительные реакции (образование кислоты) проявляются желтым окрашиванием и возникают, как правило, в течение срока от 24 час до 48 час.

7.4.6.2 Тест КАМП

Засеять в свили культуры *S. aureus* и *R. equi* простыми линиями поперек чашки с кровяным агаром (3.1.7 или 3.1.10) таким образом, чтобы 2 культуры были параллельными и диаметрально противоположными друг другу (смотри рисунок 3).

Необходимо использовать тонкий и равномерный жидкий посевной материал. Этого можно добиться, используя иглу для засеивания (4.1.8) или петлю (4.1.7), поддерживаемую под прямым углом к агару.

Засеять в свили испытуемый штамм схожим образом под прямым углом по отношению к этим культурам, таким образом, чтобы испытуемая культура и культуры реакции не соприкасались друг с другом, но находились на расстоянии примерно от 1 мм до 2 мм от их ближайшего соседа.

Несколько испытуемых штаммов могут засеиваться в свили одной и той же чашки.

— Одновременно, засеять в свили контрольные культуры *L. monocytogenes*, *L. innocua* и *L. ivanovii*. Если используется кровяной агар (3.1.7), инкубировать чашки при 37°C в течение периода от 18 час до 24 час, в сушильном шкафу (4.1.3). Если используются чашки с двойными штаммами, инкубировать при 37°C в течение периода от 18 час до 24 час, в сушильном шкафу (4.1.3).

Считать реакцию положительной, если зона проявления β-гемолиза на пересечении испытуемого штамма и культуры *S. aureus* показывает положительную реакцию.

Положительная реакция с *R. equi* выражается наличием широкого «наконечника стрелы» (от 5 мм до 10 мм) гемолиза.

Это выражается небольшой закругленной проявившейся зоной гемолиза, распространяющейся исключительно на 2 мм, начиная от испытуемого штамма, и идущей внутрь зоны, слабо гемолитической по причине роста культуры *S. aureus*. Схожую реакцию можно наблюдать внутри испытуемой культуры с *R. equi*, но она считается отрицательной.

Не появляются большие зоны гемолиза вокруг культуры *S. aureus*.

7.5 Толкование морфологических и физиологических характеристик, а также биохимической реакции

(смотри таблицу 1)

— Все *Listeria* spp. проявляются в форме маленьких грамположительных палочек (только для культур сроком 24 часа), которые показывают подвижность в свежем состоянии и в подвижной среде.

— Они являются положительными на каталазе. *L. monocytogenes* используют рамнозу, но не ксилозу.

— *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* и *L. seeligeri* (слабая реакция) производят α-гемолиз в высеивании на кровяном агаре.

Извлечь колонии для исследования гемолиза внизу колонии. Из трех гемолитических *Listeria* spp., только *L. monocytogenes* не использует ксилозу и дает положительную реакцию в том, что касается использования рамнозы.

— *L. monocytogenes* и *L. seetigeri* (слабые реакции) дают положительную реакцию при тесте КАМП с *S. aureus*, но не с *R. equi*.

— *L. ivanovii* реагирует с *R. equi*, но не с *S. aureus*. Прочие *Listeria* spp. дают отрицательные реакции при тесте КАМП с двумя культурами провоцирования реакции.

7.6 Итоговое подтверждение

Штаммы, которые считаются относящимися к *Listeria* spp. (7.5) могут быть подтверждены с помощью итоговой идентификации.

— На сыром молоке, иногда отмечают, что производя повторное высеивание бульона обогащения после инкубации в течение периода от 24 час до 48 час, можно повысить чувствительность метода.

— Отмечалось, что метод менее чувствителен в отношении некоторых сыров со светлой коркой и некоторых сыров с плесенью в сравнении с прочими продуктами (так, чувствительность метода для лимбургского сыра слабее при концентрациях *L. monocytogenes* меньше чем два микроорганизма на грамм). Что касается некоторых сортов сыра, инкубация бульона обогащения должна быть увеличена до 7 дней.

Если бульон обогащения был инкубирован в течение 48 час, затем через 7 дней, необходимо засеять чашки с изолирующей средой.

— Можно использовать метод для обнаружения

L. monocytogenes в образцах, отобранных на

производственных участках. Тем не менее, не проводилось какое-либо совместное испытание, чтобы узнать, выявлялся ли этот организм в этих образцах.

7.7 Контрольные культуры

С целью контроля того, что культуры обогащения и идентификации способны обеспечить рост *L. monocytogenes*, ввести раствор эталонной культуры недавно изолированных штаммов в контрольный флакон среды обогащения (смотри 7-2). Добавить от 10 до 100 клеток *L. monocytogenes* на флакон.

Выполнить с контрольными флаконами те же операции, что и с флаконами, содержащими испытательную культуру, чтобы наглядно продемонстрировать, что обнаруживается положительная контрольная культура.

8. Выражение результатов

Согласно выполненному толкованию результатов, сообщить о наличии или отсутствии *L. monocytogenes* в анализируемом образце, указав массу в граммах или объем

в миллилитрах образца, подвергнутого испытанию.

9. Отчет об испытаниях

В отчете об испытаниях должен быть указан метод, согласно которому проводился отбор образцов, если он известен, а также использованная методика, полученный результат испытаний, и проверялась ли воспроизводимость результатов, полученный итоговый результат.

Кроме того, в нем необходимо указать все подробности операций, не предусмотренных в настоящем методе, или же факультативных, а также события, которые возможно могли повлиять на результат испытаний.

В отчете об испытаниях должны быть указаны все сведения, необходимые для полной идентификации образца.

**Таблица 1 – Реакция в целях идентификации
*Listeria spp***

Вид	Тест КАМП		Тест КАМП	
	Рамино за	Ксило за	S. aureus	R. équi
<i>L. monocytogenes</i>	+	—	+	—
<i>L. innocua</i>	V	—	—	—
<i>L. ivanovii</i>	—	+	—	+
<i>L. seeligeri</i>	—	+	(+)	—
<i>L. welshimeri</i>	V	+	—	—
<i>L. grayi</i>	—	—	—	—
<i>L. murrayi</i>	V			
V = неустойчивая реакция (+) = слабая реакция + = положительная реакция — = реакция отсутствует				

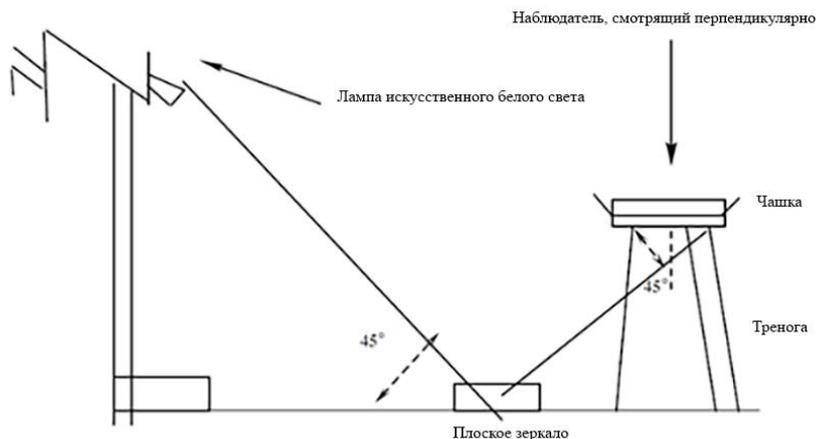


Рисунок 2 - Изучение чашек на предмет выявления подозрительных колоний

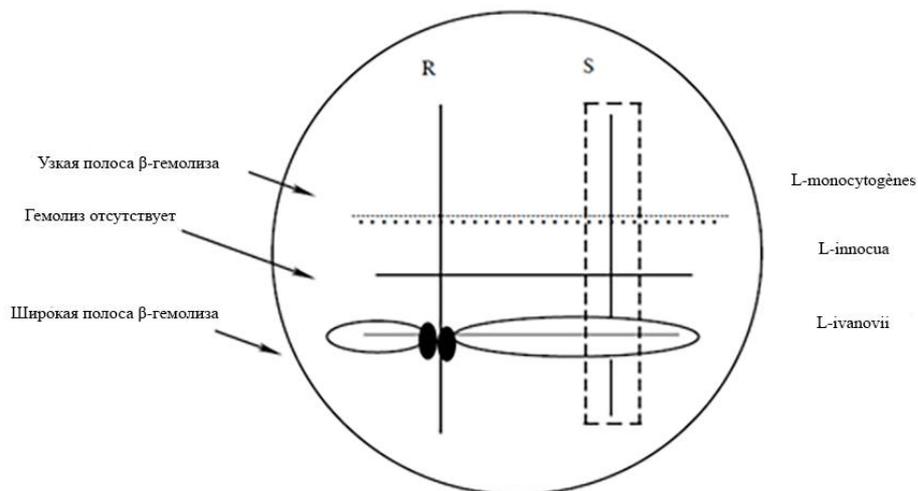


Рисунок 3 – Засеивание чашек для теста КАМП

Примечания

1- Засеивание мелких чашек с кровяным агаром, как проиллюстрировано на диаграмме.

Вертикальные линии – это свили *S. aureus* (S). Горизонтальные линии – это свили испытуемых культур, заштрихованные части показывают зоны проявившегося гемолиза.

2- Часть, показанная пунктиром, ограничивает зону влияния культуры *S. aureus*.