МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ДРОЖЖИ КОРМОВЫЕ

Метод ускоренного обнаружения сальмонелл

Издание официальное

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ
ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
Минск

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным научно-исследовательским институтом биосинтеза белковых веществ (ГОСНИИсинтезбелок).

ПРЕДСТАВЛЕН МТК 326 «Продукция микробиологического синтеза»

ВНЕСЕН Госстандартом Российской Федерации

2 ПРИНЯТ Межгосударственным Советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 12 от 21.11.97)

За принятие проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа по стандартизации
Азербайджанская Республика	Азгосстандарт
Республика Армения	Армгосстандарт
Республика Беларусь	Госстандарт Беларуси
Грузия	Грузстандарт
Республика Казахстан	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизская Республика	Киргизстандарт
Республика Молдова	Молдовастандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Республика Таджикистан	Таджикгосстандарт
Туркменистан	Главная государственная инспекция Туркменистана
Украина	Госстандарт Украины

3 Постановлением Государственного комитета Российской Федерации по стандартизации, метрологии и сертификации от 19 марта 1998 г. № 67 межгосударственный стандарт ГОСТ 30134—97 введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта Российской Федерации с 1 января 1999 г.

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания на территории Российской Федерации без разрешения Госстандарта России

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ДРОЖЖИ КОРМОВЫЕ

Метод ускоренного обнаружения сальмонелл

Fodder yeast. Method of accelerated determination of salmonells

Дата введения 1999—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на дрожжи кормовые и устанавливает метод ускоренного обнаружения сальмонелл в навеске продукта.

Сущность метода заключается в посеве исследуемой пробы продукта на высокопитательные жидкие среды, культивировании посевов в условиях встряхивания, постановке реакции агглютинации с высокочувствительной высокоспецифичной сальмонеллезной Н-сывороткой как с жидких сред, так и с пересевов на стандартные плотные среды, минуя стадию выделения чистой культуры, что позволяет сократить срок анализа по предлагаемому методу с 6—7 до 1—2 сут.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 975—88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4208—72 Соль закиси железа и аммония двойная сернокислая (соль Мора). Технические условия

ГОСТ 4209—77 Магний хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5833—75 Сахароза. Технические условия

ГОСТ 5962—67* Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6038—79 Д-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6691—77 Карбамид. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8074—82 Микроскопы инструментальные. Типы, основные параметры и размеры. Технические требования

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9412—93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 10444.1—84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14261—77 Кислота соляная особой чистоты. Технические условия

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 24104—88** Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000.

** С 1 июля 2002 г. вводится в действие ГОСТ 24104—2001.

Издание официальное

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 27068—86 Натрий серноватистокислый (натрия тиосульфит) 5-водный. Технические условия

ГОСТ 28178—89 Дрожжи кормовые. Методы испытаний

3 Сокращения и обозначения

СЛ — среда Левина.

СП — среда Плоскирева.

ВСА — висмут-сульфит агар.

СПО — среда предобогащенная на основе пептона или дрожжевого экстракта «Фаворит».

КДСМ — комбинированная двууглекислая среда с мочевиной.

рА — реакция агглютинации с родоспецифической сальмонеллезной поливалентной Н-сывороткой.

рАЛ — реакция агглютинации с латексным сальмонеллезным Н-диагностикумом.

Посев 1 — навеска исследуемой пробы в СПО после 6 ч термостатирования при 37 °С.

Посев 2 — навеска исследуемой пробы в СПО после 18 ч термостатирования при 37 °С.

4 Средства контроля и вспомогательные устройства

4.1 Аппаратура, материалы, реактивы

Автоклав любого типа.

Бани водяные различных моделей с терморегулятором и встряхивателем, обеспечивающие подогрев до 37 °С и частоту встряхивания 150—200 об/мин.

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Термостат электрический с автоматическим терморегулятором.

Микроскоп любого типа по ГОСТ 8074.

Колбы конические плоскодонные вместимостью 250—500 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Пипетки пастеровские.

Цилиндры и колбы вместимостью 100, 200, 500 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Стекла предметные по ГОСТ 9284.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

Бриллиантовый зеленый кристаллический.

Глюкоза кристаллическая гидратная по ГОСТ 975, х.ч. или Д-глюкоза по ГОСТ 6038, х.ч. или ч.д.а.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х.ч.

Кислота соляная концентрированная по ГОСТ 3118 или кислота соляная особой чистоты по ГОСТ 14261, х.ч. или ч.

Лактоза, х.ч.

Сахароза по ГОСТ 5833.

Магний хлористый 6-водный, х.ч., ГОСТ 4209.

Карбамид (мочевина) по ГОСТ 6691, х.ч. и водный раствор с массовой долей 20 %.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х.ч.

Натрий серноватистокислый (натрия тиосульфат) 5-водный по ГОСТ 27068, х.ч.

Парадиметиламинобензальдегид.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300 или спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Спирт амиловый.

Соль закиси железа и аммония двойная сернокислая (соль Мора) по ГОСТ 4208.

Феноловый красный, водный раствор массовой долей 0,4 %.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Реактив Ковача.

Среда Левина (агар с эозин-метиленовым синим, сухой).

Среда Плоскирева (бактоагар Плоскирева).
Реактив Эрлиха.
Среда питательная для первичной дифференциации энтеробактерий, сухая (типа Клиглера).
Среда питательная с индикатором ВР и лактозой, сухая (среда Гисса).
Среда Симмонса (цитрат-агар Симмонса).
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.
Раствор физиологический pH 7,0 по ГОСТ 10444.1.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
Дрожжевой экстракт «Фаворит» по нормативному документу.
Экстракт дрожжевой по ГОСТ 10444.1.

Допускается применение других средств измерения с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

5 Порядок подготовки к испытанию

5.1 Приготовление питательных сред и реактивов по ГОСТ 10444.1 со следующими дополнениями:

5.1.1 Для приготовления магниевой среды на основе пептона используют следующие компоненты:

пептон, г	4,2
натрий хлористый, г	7,0
калий фосфорнокислый однозамещенный, г	1,5
экстракт дрожжевой, $см^3$	20,0
воду дистиллированную, $см^3$	890,0

Компоненты растворяют в дистиллированной воде при кипении, затем добавляют растворы:
а) магний хлористый — 36,0 г,
воду дистиллированную — 90,0 $см^3$,
б) водный раствор бриллиантового зеленого массовой долей 0,1 % — 5,0 $см^3$.
Среду разливают в колбы и стерилизуют при (112±1) °С в течение 20 мин.

5.1.2 Для приготовления магниевой среды на основе дрожжевого экстракта «Фаворит» используют компоненты, указанные в 5.1.1, за исключением пептона и дрожжевого экстракта. Взамен их используют 10,0 г дрожжевого экстракта «Фаворит».

Приготовление среды и ее стерилизацию осуществляют, как описано в 5.1.1.

5.1.3 Для приготовления среды предобогащения на основе пептона используют следующие компоненты:

пептон, г	10,0
экстракт дрожжевой, г	2,0
натрий хлористый, г	5,0
натрий фосфорнокислый, двузамещенный, г	9,0
калий фосфорнокислый, однозамещенный, г	1,5
воду дистиллированную, $см^3$	1000,0.

Компоненты растворяют в дистиллированной воде и доводят до кипения. Фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют при (120±1) °С в течение 20 мин. Готовая среда должна иметь pH 7,0±0,1.

5.1.4 Для приготовления СПО на основе дрожжевого экстракта «Фаворит» используют компоненты, указанные в 5.1.3, за исключением пептона и дрожжевого экстракта. Взамен их используют 15,0 г дрожжевого экстракта «Фаворит».

Приготовление среды и стерилизацию осуществляют так же, как указано в 5.1.3.

5.1.5 Для приготовления комбинированной двууглеводной среды с мочевиной используют компоненты:

среду питательную с индикатором ВР и лактозу сухую (среда Гисса), г	40,0
агар, г	5,0
мочевину, г	10,0
глюкозу, г	1,0
соль Мора, г	0,2
натрия тиосульфат, г	0,3
воду дистиллированную, $см^3$	1000,0.

Компоненты, кроме мочевины, растворяют в дистиллированной воде и доводят до кипения. Затем добавляют мочевину и растворяют, не нагревая среду.

Среду разливают в пробирки по 6—8 см³ и стерилизуют текучим паром 30 мин. Скашивают среду в пробирках, оставив столбик среды высотой 3 см.

Цвет готовой среды — бледно-сиреневый.

5.1.6 Для приготовления комбинированной среды Олькеницкого используют компоненты:

агар, г	25,0
лактозу, г	10,0
сахарозу, г	10,0
глюкозу, г	1,0
мочевину, г	10,0
натрия тиосульфат, г	0,3
соль Мора, г	0,2
водный раствор фенолового красного с массовой долей 0,4 %, см³	10,0
воду дистиллированную, см³	1000,0.

Соли предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Углеводы и мочевину растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, подогревая на водяной бане.

Агар расплавляют в оставшейся дистиллированной воде при нагревании и помешивании.

Затем все компоненты соединяют, перемешивают с расплавленным агаром, фильтруют через марлевый фильтр и устанавливают pH 7,2—7,4. Добавляют индикатор, хорошо перемешивают и разливают в пробирки по 6—7 см³. Стерилизуют текучим паром в течение 3 дн. по 20 мин.

Скашивают среду в пробирках, оставляя столбик высотой 2—2,5 см.

Готовая среда — бледно-розового цвета.

5.1.7 Приготовление среды Клиглера с мочевиной.

5,5 г сухого порошка стандартной среды засыпают в колбу, наливают 100 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают и на слабом огне доводят до кипения. Кипятят 3—5 мин, закрыв ватной пробкой. Затем среду фильтруют через предварительно смоченный водой и отжатый марлевый фильтр. Добавляют 1 см³ водного раствора мочевины, тщательно перемешивают. Разливают в пробирки по 7 см³ и стерилизуют при (112±1) °С 20 мин или текучим паром — 30 мин.

Допускается вносить в асептических условиях 0,1 см³ стерильного раствора мочевины в пробирку с расплавленной после стерилизации стандартной средой. Полученную среду затем скашивают, как указано в 5.1.5.

5.1.8 *Приготовление тест-реактивов на индол*

5.1.8.1 Для приготовления реактива Эрлиха используют компоненты:

парадиметиламинобензальдегид, г	1,0
спирт этиловый, см³	95,0
кислоту соляную концентрированную, см³	20,0

Альдегид растворяют в спирте и добавляют соляную кислоту.

Хранят при температуре около 4 °С без доступа света.

5.1.8.2 Для приготовления реактива Ковача используют компоненты:

парадиметиламинобензальдегид, г	5,0
спирт амиловый, см³	75,0
кислоту соляную концентрированную, см³	25,0

Растворяют парадиметиламинобензальдегид в спирте при легком нагревании на водяной бане при температуре (50±1) °С. Охлаждают и добавляют соляную кислоту.

Реактив имеет бледно-желтый цвет.

Хранят реактив Ковача около 4 °С не более одного месяца.

5.1.9 *Приготовление стандартных сред*

Стандартные питательные среды: среда Гисса, висмут-сульфит агар, среда Левина, среда Плоскирева, среда Клиглера, среда Симмонса, готовят в соответствии с указаниями на упаковке.

5.2 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с ГОСТ 28178.

Пробы отбирают пробоотборником, допускается металлической ложкой или небольшим совком. Пробоотборник, металлическую ложку или совок стерилизуют фламбированием (проти-

рание ватой, смоченной спиртом, с последующим обжиганием на огне) или в сушильном шкафу в течение 1,5 ч при 150—170 °С.

Из точечных проб составляют объединенную пробу не менее 500 г, из объединенной пробы выделяют две средние пробы по 50 г.

Пробы помещают в стерильные колбы или флаконы с ватно-марлевой пробкой.

Колбы или флаконы для проб стерилизуют в течение 1,5 ч при 150—170 °С.

Одну из колб со средней пробой (или флаконов) используют для анализа, вторую опечатывают или пломбируют и хранят не менее 2 мес на случай проведения контрольных испытаний.

6 Порядок проведения испытаний

6.1 Навеску продукта массой 50 г вносят в стерильную колбу вместимостью 500 см³, содержащую 250 см³ СПО, и термостатируют в течение 6 ч при (37±1) °С и частоте встряхивания 180—200 об/мин (Посев 1). Указанный режим встряхивания позволяет исключить намокание ватно-марлевой пробки.

Допускается навеску продукта 50 г разделить на две части по 25 г и поместить их в две одинаковые колбы вместимостью 250 см³, содержащие 125 см³ СПО.

6.2 Посев 1 массой 10 см³ пересевают в стерильную колбу вместимостью 250 см³, содержащую 100 см³ магниевой среды и термостатируют 18 ч при (37±1) °С.

В случае, если 50 г продукта были разделены на две части и выращивались в двух колбах с СПО, их объединяют пересевом по 5 см³ из каждой колбы в одну, вместимостью 250 см³, содержащую 100 см³ магниевой среды и термостатируют 18 ч при (37±1) °С.

6.3 Одновременно с пересевом Посева 1 в магниевую среду проводят его высев на чашки Петри с плотными дифференциально-диагностическими средами ВСА, СЛ или СП.

Для изолированных колоний высев проводят бактериологической петлей истончающим штрихом.

Посевы в чашках Петри со средами Л или П термостатируют 18—24 ч при (37±1) °С, с ВСА — 48 ч при (37±1) °С.

6.4 Колбу с Посевом 1, после проведенных пересевов в магниевую среду и на плотные среды продолжают термостатировать до 18—24 ч (Посев 2).

Посев 2 пересеивают в магниевую среду и высеивают на плотные среды и термостатируют, как в 6.2 и 6.3.

6.5 Все пересевы на плотные среды после термостатирования изучают и отмечают рост характерных колоний.

Чашки с СЛ или СП просматривают в проходящем (лучше дневном) свете, со средой ВСА — в отраженном.

На СЛ и СП сальмонеллы растут в виде круглых, блестящих, бесцветных (или цвета исходной питательной среды), прозрачных в проходящем свете колоний без выраженного центра. Колонии могут иметь нежно-розовый цвет.

На среде ВСА колонии сальмонелл образуют круглые черные или темно-коричневые блестящие с зеркальным или «металлическим» блеском колонии. Цвет участка среды под колониями — черный.

Некоторые серовары сальмонелл растут на ВСА в виде нежных, серовато-зеленых колоний с выраженным черным центром или без него.

Колонии могут иметь гладкую поверхность и ровный край (У-форма), могут иметь край слегка «зазубренный» (Р-форма или переходные формы).

6.6 При наличии большого числа колоний, подозрительных на содержание сальмонелл, их изучают в серологических реакциях: реакция агглютинации с родоспецифической сальмонеллезной поливалентной Н-сывороткой (рА) или реакция агглютинации с латексным сальмонеллезным Н-диагностикумом (рАЛ).

В некоторых случаях, если на изучаемых чашках имеется небольшое количество подозрительных колоний (1—3) и их небольшой биомассы недостаточно для постановки рА или рАЛ, такие колонии перевивают на скошенный столбик с одной из дифференциальных сред по выбору: КДСМ, Олькеницкого или Клиглера.

Посев проводят сначала штрихом на скошенную часть КДСМ, а затем уколом в глубину столбика.

Посевы термостатируют при (37±1) °С 18—24 ч.

6.7 Типичные культуры сальмонелл ферментируют глюкозу, частично с образованием газообразных продуктов; не ферментируют лактозу; образуют сероводород; не ферментируют мочевину. Часть культур замедленно продуцирует сероводород или не продуцирует его совсем.

Ферментация глюкозы исследуемой культурой выражается изменением цвета столбика: КДСМ — голубовато-зеленый цвет, среды Олькеницкого — оранжево-розовый, среды Клиглера — желтый.

Образование газообразных продуктов при ферментации глюкозы выражается разрывом столбика агара или скоплением пузырьков газа.

Отсутствие ферментации лактозы на КДСМ не меняет цвет скошенной части КДСМ.

Образование сероводорода изучаемой культурой выражается почернением среды на границе скошенной части и столбика или на дне пробирки.

При разложении мочевины КДСМ изменяет цвет скошенной части и столбика на ярко-оранжевый.

Среда Олькеницкого остается розовой, среда Клиглера приобретает малиновый цвет.

Культуры, ферментирующие на комбинированных средах в течение 18—24 ч лактозу или разлагающие мочевину, не относятся к роду сальмонелл.

6.8 Культуры, подозрительные на сальмонеллы, обладающие нетипичными биохимическими свойствами, должны быть изучены по серологическим свойствам и дополнительным биохимическим тестам.

Изучение серологических свойств заключается в постановке рА и рАЛ.

6.9 Для проведения рА на предметное стекло наносят каплю физиологического раствора, рядом — каплю сыворотки.

Если на плотных средах обнаружен рост крупных, диаметром более 3 мм подозрительных на сальмонеллы колоний, то половину колоний снимают бактериологической петлей, вносят ее биомассу в обе капли, начиная с физиологического раствора, и равномерно растирают.

При положительной реакции через 0,5—2,0 мин в капле сыворотки образуются четко различимые хлопья, жидкость между ними прозрачна.

Сомнительная реакция — образование нечетких, очень грубых или очень мелких хлопьев с мутным фоном капли при времени наблюдения свыше 2 мин.

Отрицательная реакция выглядит идентично взвеси испытуемой культуры в капле физиологического раствора.

При наличии сомнительной реакции или феномена аутоагглютинации (образование хлопьев в капле физиологического раствора) следует взять для испытания другие колонии или повторить высев пробы на плотные среды.

При обнаружении на плотных средах мелких, диаметром до 2 мм колоний, подозрительных на сальмонеллы, допускается брать для постановки рА несколько однотипных колоний, чтобы биомассы было достаточно для постановки рА.

6.10 Постановка рАЛ осуществляется как с плотных, так и с жидких сред.

6.10.1 При постановке рАЛ с плотных сред на предметное стекло наносят бактериологической петлей половину подозрительных на сальмонеллы колоний (или при отсутствии изолированных колоний допускается взять петлей смесь культур, включающих подозрительные колонии). Затем обводят стеклографом или восковым карандашом два кружка диаметром 15 мм и в каждый пастеровской пипеткой вносят две капли разбавителя и растирают бактериологической петлей.

Затем в один кружок вносят пастеровской пипеткой 1 каплю сальмонеллезного диагностикума, а в другой 1 каплю контрольного диагностикума, перемешивают петлей, стекло покачивают 5—7 мин руками или на встряхивателе.

После этого анализируют результаты реакции.

Если результат отрицательный, то стекло помещают в чашку Петри (не допуская перелива капель за пределы очерченных на стекле границ), закрывают крышкой и помещают в термостат при (37±1) °С на 20—40 мин, после чего проводят окончательный учет визуально на темном фоне, не вынимая стекол из чашек, по 4-крестной системе:

4 креста — четкая агглютинация частиц с образованием больших скоплений, фон — прозрачный;

3 креста — большие и малые скопления агглютината, фон — почти прозрачный;

2 креста — малые, но отчетливые скопления частиц, фон — мутноватый;

1 крест — слабая гранулярная агглютинация на мутном фоне, агглютинация отсутствует, фон — равномерно мутный.

В каждом комплекте диагностикума необходимо провести предварительный контроль на отсутствие спонтанной агглютинации.

Для этого на предметном стекле, по описанному выше способу, соединяют две капли разбавителя с 1 каплей специфического сальмонеллезного диагностикума и контрольного диагностикума (в параллельной реакции).

Изучение реакции проводят аналогично вышеописанному.

Диагностикумы считают годными при отсутствии спонтанной агглютинации.

Положительной рАЛ считают агглютинацию частиц латекса не менее чем на два креста с сальмонеллезным диагностикумом, при отрицательной реакции с контрольным диагностикумом.

Положительная рАЛ одновременно с двумя диагностикумами (со специфическим и контрольным) свидетельствует о неспецифической агглютинации и учету не подлежит.

6.10.2 Постановку рАЛ с жидких селективных питательных сред осуществляют с Посевами 1 и 2.

Для этого на предметное стекло с очерченными кружками (см. 6.10.1) наносят по две капли магниевой среды и добавляют по одной капле сальнонеллезного или контрольного диагностикума.

Изучение реакции, как указано в 6.1.10.

7 Обработка результатов испытаний

7.1 Положительные результаты рА и рАЛ с сальмонеллезной Н-сывороткой или Н-диагностикумом, полученные при их постановке с изолированными колониями или в смешанной культуре на чашках с селективными дифференциально-диагностическими средами (ВСА, Левина или Плоскирева), указывают на присутствие сальмонелл.

7.2 Положительные результаты рАЛ с сальмонеллезными Н-диагностикумами, полученные при ее постановке с жидких селективных сред или после вторичного подращивания в СПО (см. 6.10.2), свидетельствуют об обнаружении сальмонелл.

7.3 Положительные результаты рА с поливалентной Н-сывороткой или с сальмонеллезным Н-диагностикумом, полученные при их постановке с чистой культурой на среде КДСМ, свидетельствуют об обнаружении сальмонелл.

7.4 При обнаружении подозрительных на сальмонеллы колоний на плотных средах или типичных для сальмонелл культур на КДСМ и при отрицательных результатах рА и рАЛ с сальмонеллезной поливалентной Н-сывороткой или Н-диагностикумом необходимо дополнить анализ постановкой рА с поливалентными стандартными сальмонеллезными сыворотками ABCDE-групп и редких групп, или рА с поливалентными латексными сальмонеллезными диагностикумами ABCDE-групп и редких групп, а также постановкой тестов на обнаружение индола и утилизацию цитрата на среде Симмонса с чистыми культурами, подозрительными на сальмонеллы.

Выделение чистых культур осуществляют либо отсевом подозрительных колоний на КДСМ (см. 6.6), либо повторным рассевом смешанных культур на среды Левина или Плоскирева (по выбору) для выделения изолированных колоний (см. 6.3), которые повторно пересевают на КДСМ для учета биохимических свойств.

7.4.1 *Определение индолобразования*

Изучаемую культуру высевают бактериологической петлей в пробирку, содержащую 4—5 $см^3$ пептонной воды. Посев инкубируют при (37±1) °С и встряхивают с частотой 180—200 об/мин в течение 20 ч. К бульонной культуре добавляют 3—4 капли реактива Эрлиха или Ковача (по выбору).

Появление розового или красного окрашивания свидетельствует об образовании индола изучаемой культурой.

Подавляющее большинство штаммов сальмонелл не образуют индола.

7.4.2 *Определение утилизации цитрата на среде Симмонса*

Стандартную среду Симмонса приготовляют, разливают по пробиркам и скашивают в соответствии с указаниями на упаковке среды.

Исследуемый штамм в чистой культуре высевают штрихом по скошенной поверхности среды.

Посев выращивают при (37±1) °С в течение 24—48 ч. Положительный результат — видимый рост культуры и посинение среды.

Подавляющее большинство сальмонелл способны давать видимый рост и изменение цвета среды Симмонса.

7.4.3 Результаты серологических реакций с чистыми и смешанными культурами оценивают по таблице 1.

Таблица 1

рА или рАЛ с поливалентными Н-сыворотками или Н-диагностикумом		рА или рАЛ с О-поливалентной сывороткой или диагностикумом		рА с физиологическим раствором или рАЛ с разбавителем	Результат оценки
		ABCDE-групп	редких групп		
1	+	+	+	+	Аутоагглютинирующий штамм. Исследованию не подлежит
2	+	+	+	—	Сальмонеллы Р-формы
3	+	+	—	—	Сальмонеллы
4	+	—	—	—	Сальмонеллы
5	—	+	—	—	Возможно сальмонеллы
6	—	—	+	—	Возможно сальмонеллы
7	—	—	—	—	Возможно неагглютинирующий штамм сальмонелл

Примечания

1 Знак «+» означает положительную реакцию на менее чем на два креста; знак «—» означает отрицательную реакцию и положительную реакцию на один крест.

2 Результаты оценки подпунктов 1, 5, 6, 7 следует дополнить анализом биохимических свойств чистой культуры в соответствии с 6.4, 6.5, 7.4.2 настоящего стандарта. При обнаружении аутоагглютинирующего штамма или получении отрицательных результатов рА или рАЛ со всеми видами сальмонеллезных сывороток и при типичных биохимических свойствах чистой культуры (см. табл. 2) штамм оценивают как принадлежащий к роду сальмонелл.

Результаты биохимического тестирования чистых культур оценивают по таблице 2.

Таблица 2

Биохимический тест							Результат оценки
Ферментация		Продукция газа из глюкозы	Разложение мочевины	Продукция		Рост на среде Симмонса	
лактозы	глюкозы			сероводорода	индола		
—	+	+	+	—	+	+	Типичная культура сальмонелл
—	+	±	—	±	+ Очень редко	+	Атипичная культура сальмонелл
Замедленно	±	+	±	+	—	+	Сальмонеллы III подрода Аризона

Примечания

1 Знак «—» означает отсутствие указанного признака.

2 Знак «+» означает присутствие фермента углевода, продукции фермента или газа, наличие роста.

3 Все другие варианты комплекса биохимических тестов не идентифицируют как сальмонеллы

7.5 При положительных результатах серологических реакций

- рАЛ Посевов 1 и 2 в магниевую среду;
- рА или рАЛ высевов на плотные среды

выдают заключение об обнаружении сальмонелл в испытуемой пробе.

7.6 При отрицательных результатах рА или рАЛ, но при обнаружении колоний, подозрительных на сальмонеллы, испытание продолжают изучением этих колоний выделением чистой культуры путем отсева на КДСМ, постановкой других биохимических тестов и серологических реакций в соответствии с 7.4.

7.7 При отрицательных результатах серологических реакций, в соответствии с 7.5, отсутствии подозрительных на сальмонеллы колоний или отрицательных результатов их биохимического тестирования выдают заключение об отсутствии сальмонелл в испытуемой пробе.

8 Техника безопасности

8.1 Испытания по индикации сальмонелл проводят в отдельном помещении, которое запирают и пломбируют после окончания рабочего дня, или в боксе лаборатории, расположенном рядом с автоклавной.

8.2 Бокс должен иметь бактерицидные лампы, сосуды с дезинфекционными растворами для отработанной микробиологической посуды (пипетки, шпатели, предметные стекла и др.), отдельные термостат и холодильник.

8.3 Все виды посевов и выделенные культуры должны находиться в вышеуказанном боксе. Запрещается вынос посевов и культур в другие помещения лаборатории.

По окончании работы посевы помещают в запирающиеся термостаты или холодильники.

8.4 Отработанный материал в чашках, пробирках, колбах, флаконах помещают в металлические бюксы и загружают в автоклав. Автоклавирование осуществляют при давлении 1 атм в течение 30 мин.

8.5 Работу по обнаружению и выделению сальмонелл проводят только с помощью инструментов (пинцетов, шпателей, бактериологических петель и т.п.). Пользоваться пипетками допустимо только с помощью резинового баллона (груши, спрынцовки) с дополнительным ватным фильтром, вмонтированным в стеклянную трубочку.

8.6 Посев материалов проводят вблизи огня горелки с обжиганием петли, краев пробирки или флакона.

8.7 В качестве дезинфицирующего раствора используют 3 %-ный раствор хлорамина, в который погружают пипетки, шпатели и предметные стекла на 10—12 ч.

8.8 Внутренние поверхности термостатов, холодильников, поверхности рабочих столов и руки работников обрабатывают 70 %-ным раствором этилового спирта ежедневно по окончании работы.

8.9 Защитную одежду (халаты, косынки и др.) дезинфицируют замачиванием в 3 %-ном растворе хлорамина на 2 ч.

8.10 В случае аварии (разбрызгивания материалов с культурами и т.д.) работу прекращают. Все предметы, на которые могли попасть брызги, заливают 3 %-ным раствором хлорамина на 2 ч, руки обрабатывают 70 %-ным этиловым спиртом.

Помещение подвергают влажной уборке 1 %-ным раствором хлорной извести или 3 %-ным раствором перекиси водорода с последующим облучением бактерицидной лампой.

МКС 07.100.30
62.120

С19

ОКСТУ 9291

Ключевые слова: сальмонелла, культивирование, реакция агглютинации, диагностикум, серологическая реакция, антиген, селективная среда, латекс, отбор проб, приготовление питательных сред

СОДЕРЖАНИЕ

ГОСТ 13979.0—86	Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб	3
ГОСТ 13979.1—68	Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Методы определения влаги и летучих веществ	6
ГОСТ 13979.2—94	Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Метод определения массовой доли жира и экстрактивных веществ	9
ГОСТ 13979.3—68	Жмыхи и шроты. Метод определения суммарной массовой доли растворимых протеинов	15
ГОСТ 13979.4—68	Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Методы определения цвета, запаха, количества темных включений и мелочи	18
ГОСТ 13979.5—68	Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Метод определения металлопримесей	21
ГОСТ 13979.6—69	Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Методы определения золы	23
ГОСТ 13979.7—78	Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Метод определения аллилизотиоцианатов (аллилового масла)	26
ГОСТ 13979.8—69	Жмыхи и шроты. Методы определения свободной и связанной синильной кислоты	32
ГОСТ 13979.9—69	Жмыхи и шроты. Методика выполнения измерений активности уреазы	35
ГОСТ 13979.11—83	Жмыхи и шроты хлопковые. Метод определения свободного госсипола	38
ГОСТ 28178—89	Дрожжи кормовые. Методы испытаний	42
ГОСТ 30087—93	Дрожжи кормовые — паприн. Методы определения 3,4-бензпирена	93
ГОСТ 30134—97	Дрожжи кормовые. Метод ускоренного обнаружения сальмонелл	109

КОМБИКОРМА

Часть 6

ЖМЫХИ, ШРОТЫ И ГОРЧИЧНЫЙ ПОРОШОК. ДРОЖЖИ.

Методы анализа

БЗ 6—2001

Редактор *М.И. Максимова*
Технический редактор *Л.А. Кузнецова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *Е.Н. Мартемьяновой*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Подписано в печать 25.03.2002. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,95. Уч.-изд. л. 13,53. Тираж 800 экз. Зак. 333. Изд. № 2884/2. С4830.

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14.
e-mail: info@standards.ru
Набрано в Издательстве на ПЭВМ
Калужская типография стандартов, 248021, Калуга, ул. Московская, 256.
ПЛР № 040138

gost.e-ecolog.ru