ГОСТ 10444.7—86

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ БОТУЛИНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ И CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Группа Н09

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы выявления ботулинических токсинов и Clostridium botulinum.

Food products. Methods for detection of botulinal toxins and Clostridium botulinum

ГОСТ 10444.7—86

Взамен
ГОСТ 10444.7—75
ГОСТ 10444.8—75

МКС 07.100.30
ОКСТУ 9109

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 12 мая 1986 г. № 1214 дата введения установлена

01.07.87

Настоящий стандарт устанавливает методы выявления в пищевых продуктах ботулинических токсинов всех типов, вегетативных клеток и спор токсигенных штаммов Clostridium botulinum, определения титра ботулинических токсинов, серологического типирования токсина и выделения культур токсигенных штаммов C. botulinum типа A, B, C, D, E, F и G.

Метод выявления ботулинического токсина и определение его титра основан на выявлении симптомов клинической картины болезни и гибели животных, характерных для ботулинической интоксикации.

Серологическое типирование токсина C. botulinum осуществляется на белых мышах путем постановки защитного теста in vivo или реакции нейтрализации in vitro с диагностическими противоботулинистическими типоспецифическими антитоксическими сыворотками.

Метод выявления C. botulinum основан на его способности развиваться и образовывать ботулинические токсины в питательных средах для анаэробных микроорганизмов.

Выделение культур токсигенных штаммов C. botulinum из продукта или культуральной жидкости проводят путем высева на твердые питательные среды с последующим исследованием культуральных и морфологических признаков, характерных для C. botulinum и определением способности выделенной культуры образовывать ботулинический токсин.

Методы предназначены:

для исследования продуктов по санитарно-эпидемиологическим показаниям;

для анализа посевов продуктов, в случае обнаружения в них мезофильных анаэробных микроорганизмов.

Исследования проводят в лабораториях, указанных органами здравоохранения.

Термины, применяемые в настоящем стандарте, и пояснения к ним приведены в приложении 1.

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 5211—65.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1.1. Методы отбора проб пищевых продуктов — по ГОСТ 26668—85 и в соответствии с требованием приложения 4. Пробы пищевых продуктов подготавливают к анализу по ГОСТ 26669—85. Консервы и полуконсервы проверяют на герметичность по ГОСТ 8756.18—70 и термостатируют по ГОСТ 26669—85.

1.2. Термостатированию не подлежат: консервы и полуконсервы в негерметичной таре, бомбажные, хлопуши, консервы с видимыми невооруженным глазом признаками развития микроорганизмов и предназначенные для одновременного выявления ботулинических токсинов и C. botulinum или только ботулинических токсинов.

Издание официальное ★ **Перепечатка воспрещена**

Переиздание. Апрель 2010 г.

© ИПК Издательство стандартов, 1986
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ И РАСТВОРЫ

2.1. Для проведения испытания применяют аппаратуру, материалы, реактивы и растворы по ГОСТ 10444.1—84, а также аппаратуру, материалы, реактивы и растворы, указанные ниже:

анаэростат;

аппарат для встряхивания;

баллоны с газами (азот, водород, гелий или смесью: азот 80 %, углекислый газ — 10 %, водород — 10 %);

весы аналитические;

грушу резиновую;

доски для сушки посуды;

ерши для мойки посуды;

корзинки проволочные луженые для стерилизации;

микроскоп биологический с приспособлением для фазовоконтрастного микроскопирования;

микропипетки;

пестик для фарфоровой ступки;

петли бактериологические;

пипетки пастеровские;

пробирки центрифужные вместимостью 10—100 $см^3$;

размельчитель тканей лабораторный;

редукторы к баллонам с газом;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

стекла покровные по ГОСТ 6672—75;

фильтры асбестовые, керамические, мембранные;

флаконы вместимостью 100—500 $см^3$;

футляры металлические для стерилизации пипеток, чашек Петри, шприцев;

штативы для пипеток;

штативы для пробирок;

бумагу индикаторную;

дуршлаг;

масло иммерсионное;

перчатки резиновые;

фильтр тканевый;

мышей белых массой 15—20 г одного пола;

бриллиантовый зеленый, раствор: 0,5—1,0 г бриллиантового зеленого растворяют в 100 $см^3$ этилового спирта. Применяют для метки белых мышей;

кальций углекислый стерильный готовят по ГОСТ 10444.1—84. Добавление углекислого кальция к средам с глюкозой способствует образованию спор C. botulinum;

кислоту аскорбиновую, раствор массовой концентрацией 50 $г/дм^3$: 5 г аскорбиновой кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки, растворяют и стерилизуют фильтрованием, используя фильтры со средним диаметром пор 0,40—0,45 мкм. Раствор следует применять свежеприготовленным. Допускается использовать без стерилизации раствор аскорбиновой кислоты для инъекций. Применяют в качестве восстановителя, связывающего кислород в питательных средах для C. botulinum;

кислоту молочную, L — форма по ГОСТ 490—2006;

кислоту пикриновую, раствор: 2,5 пикриновой кислоты растворяют в 100 $см^3$ воды при нагревании. Применяют для метки белых мышей;

кислоту соляную по ГОСТ 3118—77, раствор с массовой долей соляной кислоты 4 %. Применяют для подкисления питательных сред;

масло вазелиновое по ГОСТ 3164—78 или подсолнечное по ГОСТ 1129—93*; масло вазелиновое разливают в колбы по 20—50 $см^3$ и стерилизуют горячим воздухом в стерилизаторе в течение 60 мин при температуре 140 °С; масло подсолнечное прокаливают при температуре (160±1) °С горячим воздухом в стерилизаторе в течение 2 ч, охлаждают, фасуют в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 30 мин;

мальтозу;

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52465—2005.

малахитовый зеленый;

медь сернокислую по ГОСТ 4165—78, 1 %-ный раствор. Применяют для постановки биуретовой реакции в питательных средах;

натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, раствор с массовой долей гидроокиси натрия 4 %. Применяют для подщелачивания питательных сред;

натрий углекислый по ГОСТ 83—79, 0,3—1 %-ный раствор. Применяют для кипячения игл для шприцев (см. приложение 3);

натрия тиогликолят;

неомицин;

перекись водорода по ГОСТ 177—88, раствор с массовой долей перекиси водорода 3 %;

растворы фосфатного буфера:

для приготовления фосфатного буфера готовят растворы:

А — раствор однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4 — квалификации х. ч., дважды перекристаллизованный или для pH-метрии) массовой концентрацией 9,078 г/дм^3;

Б — раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ квалификации х. ч., дважды перекристаллизованный) массовой концентрацией 11,876 г/дм^3;

для приготовления 100 см^3 фосфатного буфера:

с pH 6,0 — к 12 см^3 раствора Б добавляют 88 см^3 раствора А;

с pH 6,2 — к 18,5 см^3 раствора Б добавляют 81,5 см^3 раствора А;

с pH 6,8 — к 50 см^3 раствора Б добавляют 50 см^3 раствора А;

раствор фосфатного буфера *с* pH 6,0 применяют для растворения трипсина;

растворы желатино-фосфатного буфера:

в 100 см^3 фосфатного буферного раствора с определенным значением pH вносят 0,6 г желатина, дают набухнуть желатину и нагревают до полного растворения желатина. Стерилизуют при температуре (110±1) °С в течение 15 мин;

раствор желатино-фосфатного буфера *с* pH 6,2 применяют в качестве стабилизатора ботулинических токсинов. В случае выявления ботулинического токсина типа А переходят на раствор желатино-фосфатного буфера *с* pH 6,8;

смесь реактивов для создания анаэробных условий готовят по ГОСТ 10444.1—84. Допускается использование талька вместо инфузорной земли;

трипсин, раствор: 1,5 г трипсина растворяют в 100 см^3 раствора фосфатного буфера *с* pH 6,0. Раствор трипсина стерилизуют фильтрованием через керамический или мембранный фильтр с размерами пор 0,40—0,45 мкм или другой эквивалентный фильтр. Стерильный раствор трипсина вносят в регенерированную и охлажденную питательную среду асептически непосредственно перед использованием из расчета 1 см^3 раствора трипсина на 15 см^3 среды. Применяют для активизации протоксина C. botulinum;

гидролизат казеина ферментативный;

фломастеры (применяют для метки мышей);

циклосерин;

эмульсию яично-желточную: свежие куриные яйца моют, ополаскивают холодной водой, опускают в 70 %-ный спирт и высушивают. Разбивают каждое яйцо, соблюдая правила асептики, в стерильную чашку Петри и отделяют желток от белка. Помещают желтки в стерильную колбу или флакон с четырьмя объемами стерильной воды и энергично перемешивают. Нагревают смесь на водяной бане при температуре (45±0,5) °С в течение 2 ч, оставляют на 18—24 ч при температуре от 0 до плюс 5 °С для того, чтобы сформировался осадок.

С соблюдением правил асептики собирают эмульсию над осадком. Эмульсию хранят при температуре 0 — плюс 5 °С не более 72 ч. Применяют для определения способности C. botulinum давать положительную реакцию с яичным желтком.

3. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

3.1. При приготовлении питательных сред для выявления и культивирования C. botulinum жидкие и полужидкие среды разливают во флаконы или в пробирки таким образом, чтобы высота столбика среды составляла не менее 10 см, объем среды —30—100 см^3.

Если нет специальных указаний по хранению среды, то среду хранят в темноте при температуре (4±2) °С не более 1 мес. Сухие среды, в состав которых входят тиогликолят натрия и цистеина гидрохлорид, хранят в герметичной упаковке при температуре (4±2) °С. Приготовленные из них жидкие и полужидкие среды хранят при комнатной температуре не более 7 сут.

3.2. Для выявления и выделения C. botulinum используют следующие среды.

3.2.1. Агар желточный для анаэробов: к 1000 см³ дистиллированной воды добавляют 25,0 см³ дрожжевого экстракта, 5,0 г триптона или ферментативного гидролизата казеина, 20,0 г пептона, 5,0 г хлористого натрия и 20,0 г агара. Среду нагревают на кипящей водяной бане до расплавления агара, устанавливают pH (6,9±0,1), разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Хранят при температуре (4±2) °С не более 28 сут.

Яично-желточную эмульсию добавляют к расплавленной и охлажденной до 50 °С среде из расчета 80 см³ яично-желточной эмульсии на 1000 см³ среды, тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри. Чашки хранят при температуре (4±2) °С не более 2 сут, перед использованием подсушивают по ГОСТ 26670—91. Применяют для определения способности C. botulinum давать положительную реакцию с яичным желтком.

3.2.2. Агар печеночно-желточный; агар печеночный готовят по ГОСТ 10444.1—84.

Яично-желточную эмульсию добавляют к расплавленному и охлажденному до 50 °С печеночному агару из расчета 80 см³ желточной эмульсии на 1000 см³ агара, тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри. Чашки хранят при температуре (4±2) °С не более 2 сут, перед использованием подсушивают по ГОСТ 26670—91.

При отсутствии печеночного агара допускается заменять его мясо-пептонным агаром.

Применяют для определения способности C. botulinum давать положительную реакцию с яичным желтком.

3.2.3. Агар мясо-пептонный готовят по ГОСТ 10444.1—84.

3.2.4. Агар сахарный кровяной по Цейсслеру готовят по ГОСТ 10444.1—84.

Применяют при определении гемолитической активности C. botulinum.

3.2.5. Бульон триптиказо-пептонно-глюкозный с дрожжевым экстрактом (TPGУ) и с трипсином (TPGУТ): 50,0 г триптического перевара казеина, 5,0 г пептона, 100,0 см³ дрожжевого экстракта, 4,0 г глюкозы и 1,0 г тиогликолята натрия добавляют к 900 см³ дистиллированной воды, устанавливают pH (7,1±0,1). Стерилизуют при температуре (121±1) °С пробирки в течение 10 мин, флаконы – в течение 15 мин. Хранят при комнатной температуре не более 7 сут.

Для культивирования C. botulinum, образующих протоксин, перед употреблением к 1000 см³ бульона добавляют 60 см³ 1,5 %-ного раствора трипсина в фосфатном буферном растворе.

3.2.6. Бульон Хоттингера готовят по ГОСТ 10444.1—84.

Применяют для культивирования C. botulinum.

3.2.7. Среду из вареного мяса (Cook – Meat Medium) готовят по ГОСТ 10444.1 – 84.

Применяют для выделения и культивирования C. botulinum.

3.2.8. Среду Китт-Тароцци с углекислым кальцием готовят по ГОСТ 10444.1—84.

Применяют для выявления и культивирования C. botulinum.

3.2.9. Среду печеночно-глицериновую готовят по ГОСТ 10444.1—84.

Применяют для культивирования C. botulinum.

3.2.10. Среду питательную для контроля стерильности, сухую.

В состав среды входят:

фермент ативный гидролизат казеина неглубокой степени расщепления – 15,0 г;
витаминный препарат экстракта кормовых дрожжей 5,0 г;
натрий хлористый –6,4 г;
глюкоза – 5,0 г;
тиогликолят натрия – 0,3 г;
цистеина гидрохлорид – 0,75 г;
агар – 0,6 г;
натрий углекислый – 0,5—0,95 г;

33,0 г сухого порошка растворяют в 1000 см³ воды, тщательно размешивают, доводят до кипения, кипятят 2—3 мин при помешивании, фильтруют, разливают во флаконы. Стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Готовая среда должна иметь pH (7,0±0,2).

Среду хранят при комнатной температуре не более 7 сут.

Применяют для культивирования C. botulinum.

3.2.11. Улучшенную клостридиальную среду (R. C. M.) готовят по ГОСТ 10444.1—84.

Применяют для культивирования C. botulinum.

3.2.12. Бульон с кониной и мальтозой: к 1000 $см^3$ воды добавляют 500 г конины, кипятят в водяной бане в течение 1 ч, фильтруют, в фильтрат добавляют 30,0 г ферментативного пептона, 2,32 г двузамещенного фосфата натрия, 10,0 г мальтозы. Смесь кипятят на водяной бане в течение 30 мин, устанавливают pH (7,6±0,2), фильтруют, разливают по 10 $см^3$ в пробирки, после чего в каждую пробирку вводят 1—1,5 г вареной и измельченной конины. Пробирки стерилизуют в течение 15 мин при температуре (121±1) °С.

Применяют для культивирования C. botulinum.

3.2.13. Питательный агар с кровью и глюкозой: к 1000 $см^3$ деионированной воды добавляют 17,0 г ферментативного пептона, 15 $см^3$ дрожжевого экстракта, 5,0 г натрия хлористого, (17,0±3,0) г агара, 20,0 г глюкозы, устанавливают pH (7,2±0,2), стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. После стерилизации и охлаждения до 50 °С добавляют 200 $см^3$ крови. Допускается добавление в среду неомицина до конечной концентрации 50 $мг/см^3$ или циклосерина до 400 $мг/см^3$.

Применяют для выделения C. botulinum.

3.2.14. Питательный агар с яичным желтком и лактозой: к 1000 $см^3$ деионированной воды добавляют 17,0 ферментативного пептона, 15 $см^3$ дрожжевого экстракта, 5,0 г натрия хлористого, (17,0±3,0) г агара, устанавливают pH (7,2±0,2), стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. В стерильную расплавленную среду добавляют 20,0 г лактозы, смесь прогревают в течение 30 мин в водяной бане в кипящей воде. После охлаждения до 50 °С добавляют асептически 10 $см^3$ 0,4 %-ного раствора бромкрезолпурпура и 100 $см^3$ эмульсии яичного желтка.

Применяют для выделения C. botulinum.

4. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

4.1. Подготовка продукта к испытанию на наличие ботулинических токсинов

4.1.1. Для выявления ботулинических токсинов отбирают 100 $см^3/г$ жидкого продукта, культуральной жидкости анаэробных посевов, жидкую фракцию продуктов смешанного состава, водные экстракты или экстракты, приготовленные с физиологическим раствором пастообразных, сыпучих продуктов и продуктов твердой консистенции. Объем приготовленной исходной жидкости должен составлять около 30 $см^3$. Оставшееся количество исходной жидкости используют, при необходимости, для повторного испытания.

При отсутствии продукта в достаточном количестве выявляют ботулинические токсины в исходной жидкости меньшего объема.

Экстракты из сыпучих и твердых продуктов, не растворимых в воде, получают из соленых продуктов (содержащих более 2 % NaCl) при добавлении дистиллированной воды в соотношении 1 : 1 или 1 : 2, из несоленых и предварительно восстановленных продуктов тепловой и сублимационной сушки — при добавлении такого же количества физиологического раствора.

Предварительно измельченный ножом или ножницами продукт переносят в стерильную ступку, добавляют при необходимости стерильный песок или стерильную стеклянную крошку и доводят до однородной консистенции, постоянно добавляя воду или физиологический раствор. Смесь переносят в стерильную колбу.

Водорастворимые или пастообразные продукты смешивают с водой или физиологическим раствором в соотношении 1 : 1 или 1 : 2 в стерильной колбе.

Полученные смеси выдерживают при температуре (4±2) °С в течение 2 ч и затем извлекают из них жидкую фракцию.

Прогрев и ротационную гомогенизацию продукта для выявления ботулинических токсинов не проводят; продукт измельчают в ступке.

Жидкую фракцию отделяют от продукта отстаиванием и (или) фильтруют через ватно-марлевый или другой фильтр, не адсорбирующий ботулинические токсины или центрифугируют при температуре (4±2) °С и частоте вращения 500 $с^{-1}$ в течение 1—2 мин. Использование асбестовых фильтров

или фильтровальной бумаги не допускается. Подготовленную таким образом исходную жидкость переносят в стерильную колбу; хранят при температуре (4±2) °С не более 7 сут.

4.2. Подготовка продукта к испытанию для выявления и выделения С. botulinum

4.2.1. Для выявления и выделения С. botulinum отбирают 100 $см^3$/г продукта из различных мест, имеющих и неимеющих изменения; гомогенизируют по ГОСТ 26669—85 или доводят до однородной консистенции. Допускается для посева использовать продукт, оставшийся после отделения или экстрагирования из него жидкой фазы.

Для выявления в любых продуктах вегетативных клеток и спор С. botulinum приготавливают не менее четырех навесок массой 20,0—25,0 г ($см^3$) любого продукта.

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

5.1. Выявление ботулинических токсинов

5.1.1. Выявление ботулинических токсинов проводят по табл. 1 или одновременно с использованием противоботулинических антитоксических сывороток по табл. 2. Исследования проводят с исходной жидкостью (ИЖ), если в ней ботулинический токсин не обнаружен, то ИЖ обрабатывают протеолитическим ферментом.

Для выявления ботулинических токсинов по табл. 1 используют исходную жидкость. В две пробирки пипеткой с резиновой грушей переносят по 2—3 $см^3$, а в третью — 2,7 $см^3$ исходной жидкости. В последнюю пробирку стерильной пипеткой добавляют 0,3 $см^3$ раствора трипсина или панкреатина. В смеси исходной жидкости с ферментом с помощью раствора гидроокиси натрия или раствора соляной кислоты устанавливают pH (6,0±1). Затем пробирку со смесью термостатируют при (37±1) °С в течение 1 ч, но не дольше, периодически перемешивая содержимое. Культуральную жидкость, полученную из посевов продуктов в питательную среду, содержащую трипсин или панкреатин, протеолитическим ферментом не обрабатывают.

Вторую пробирку с исходной жидкостью кипятят на водяной бане в течение 10 мин и охлаждают до комнатной температуры. Первую пробирку с исходной жидкостью оставляют без обработки.

Хранение исходной жидкости, обработанной протеолитическим ферментом, не допускается.

Непосредственно после окончания обработки исходной жидкости протеолитическим ферментом ставят биологическую пробу на белых мышах.

5.1.2. По 0,5—1,0 $см^3$ подготовленной соответствующим образом исходной жидкости вводят в зависимости от условий опыта внутрибрюшинно не менее чем двум белым мышам, в соответствии с приложением 2. Животных осматривают через 1, 2, 4, 12 ч и далее не менее двух раз в день в течение 72 ч. Ботулинические токсины не вызывают молниеносной гибели животных; клинические симптомы ботулинической интоксикации животных токсином типа Е, как правило, появляются через 2—4 ч, токсином других типов — через 10—12 ч после инъекции. Высокие концентрации токсина могут вызвать гибель мышей в течение 1—2 ч без проявления клиники ботулизма. В этом случае ставят повторно биологическую пробу с исходной жидкостью, разведенной в 10—100 раз. Мыши болеют и погибают не раньше, чем через 2 ч после инъекции токсина, чаще всего в течение 4—6 ч. Клинические симптомы болезни и гибели мышей при ботулинической интоксикации очень характерны: шерсть взъерошивается, дыхание затруднено, мышцы брюшной стенки ослаблены и западают, давая симптом «осиная талия»; появляются судороги, паралич задних конечностей; гибель при явлениях полного паралича из-за остановки дыхания.

5.1.3. При наличии в исходной жидкости ботулинического токсина болеют и погибают с клиническими симптомами ботулинической интоксикации те животные, которым введена необработанная протеолитическим ферментом жидкость, и, если фермент не инактивировал ботулинический токсин, то болеют и погибают животные, которым введена жидкость, обработанная протеолитическим ферментом. При наличии в исходной жидкости ботулинических протоксинов болеют и погибают с клиническими симптомами ботулинической интоксикации в первую очередь те животные, которым введена обработанная ферментом жидкость; мыши, которым введена не обработанная ферментом жидкость, могут переболеть, но не погибают или погибают позже. Мыши, которым введена прокипяченная жидкость, должны оставаться на всем протяжении опыта здоровыми. Если болеют или погибают мыши, получившие прокипяченную и непрокипяченную жидкость, то исходную жидкость разводят буферным желатино-фосфатным раствором в соотношении 1 : 1 и 1 : 9 и повторяют исследования по

Таблица 1

Постановка исследований по обнаружению ботулинического токсина и определению титра токсина в исходной жидкости

Цель исследования	Объем ИЖ, $см^3$	Минимально выявляемое количество токсина в MLD ИЖ или ИЖТ, $см^3$	Способ подготовки Ж для инъекции	Объем Ж для инъекции двум мышам, $см^3$	Количество шприцев, шт	Порядок исследования
Обнаружение ботулинических токсинов	1	Токсин инактивирован	ИЖ прогретая	0,5×2	1	Вначале ставят биологическую пробу с прогретой ИЖ, затем с ИЖ и в последнюю очередь с ИЖТ
	1	2	ИЖ	0,5×2	1	
	1	2	ИЖТ	0,5×2	1	
	0,5	4	0,5 ИЖ + 0,5 ЖФБ	0,5×2	1	При неспецифических симптомах гибели животных в предыдущих вариантах
	0,1	20	0,1 ИЖ + 0,9 ЖФБ	0,5×2	1	
	2	1	Увеличенный объем ИЖ	1,0×2	1	При слабо выраженных симптомах ботулинической интоксикации
	2	1	Увеличенный объем ИЖТ	1,0×2	1	
Определение титра ботулинического токсина	$1 \cdot 10^{-2}$	200	1 ИЖ (ИЖТ)+99 ЖФБ	0,5×2	1	Биологическую пробу с ИЖ или ИЖТ начинают с наибольшего разведения
	$1 \cdot 10^{-1}$	20	1 ИЖ (ИЖТ)+9 ЖФБ	0,5×2	1	
	0,5	4	1 ИЖ (ИЖТ)+1 ЖФБ	0,5×2	1	
	$1 \cdot 10^{-5}$	200000	1 ИЖ (ИЖТ)+99999 ЖФБ	0,5×2	1	Биологическую пробу с ИЖ или ИЖТ начинают с наибольшего разведения
	$1 \cdot 10^{-4}$	20000	1 ИЖ (ИЖТ)+9999 ЖФБ	0,5×2	1	
	$1 \cdot 10^{-3}$	2000	1 ИЖ (ИЖТ)+999 ЖФБ	0,5×2	1	

Примечания:

1. ИЖ —исходная жидкость; Ж — жидкость, подготовленная соответствующим способом из ИЖ или ИЖТ для введения каждой из двух белых мышей; ИЖТ — исходная жидкость, обработанная протеолитическим ферментом; ЖФБ — буферный желатино-фосфатный раствор. Если предполагается наличие токсина C. botulinum E, то разведения более 1 ИЖТ + 999 ЖФБ не готовят.

2. Допускается титр ботулинического токсина не определять.

Таблица 2

Постановка исследований по обнаружению и типированию ботулинических токсинов

Номер варианта опыта	Исследуемый вариант	Типы противоботулинических сывороток	Состояние подопытных мышей	Условия опыта	Наличие и тип ботулинического токсина
1	ИЖ (ИЖТ)	Без сывороток	Болеют и обычно погибают со специфическими клиническими симптомами ботулизма	Концентрацию ИЖ (ИЖТ) и способ подготовки для инъекции выбирают по табл. 1	Присутствует один или несколько типов ботулинических токсинов
2	ИЖ (ИЖТ)	Трехвалентная типов А, В, Е	Живы	Мыши в 1-ом варианте погибли	Тип А, В или Е (F)* или их комбинации
3	ИЖ	Моновалентная типа А	»	То же	Тип А
4	ИЖ	Моновалентная типа В	»	»	Тип В
5	ИЖ (ИЖТ)	Моновалентная типа Е	»	»	Тип Е (тип F)*
6	ИЖ (ИЖТ)	По табл. 3	Живы мыши, получившие гомологический тип сыворотки	»	Один или несколько типов токсина, соответствующих типу (типам) сывороток, защитивших мышей от гибели

* При перекрестной реакции с сывороткой типа Е.

Таблица 3

Подбор противоботулинических сывороток для типирования ботулинических токсинов в ИЖ (ИЖТ)

Номер варианта опыта	Анализируемый продукт	Типы используемых противоботулинических сывороток и их комбинации	Типы выявляемых ботулинических токсинов или их комбинации
1	Не прошедший термическую обработку	Моновалентные типов А, В, Е и трехвалентная типов А, В, Е	А, В, Е (F) А + В + Е (F)
2	Тот же, не содержащий ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемых по 1-му варианту опыта	Моновалентная типа F	F (E)
		Моновалентная типа С	С (D)
3	Прошедший термическую обработку	Моновалентная типа А и В, бивалентная АВ	А; В; А + В
4	Тот же, не содержащий типы ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемых по 3-му варианту опыта	Моновалентная типа F	F (E)
		Моновалентная типа Е	Е (F)
		Моновалентная типа С	С (D)
5	Любой, не содержащий типы ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемые по 1—4-му вариантам опыта	Бивалентные типы: АС	А + С (D)
		АЕ	А + Е (F)
		AF	A + F (E)
		ВС	В + С (D)
		ВЕ	В + Е (F)
		BF	B + F (E)
		СЕ	С (D) + Е (F)
		CF	C (D) + F (E)
		EF	E + F

Продолжение табл. 3

Номер варианта опыта	Анализируемый продукт	Типы используемых противоботулинических сывороток и их комбинации	Типы выявляемых ботулинических токсинов или их комбинации
	Любой, не содержащий типы ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемые по 1—4-му вариантам опыта	Трехвалентные типы: ABF BCE BCF и другие Поливалентная типа ABCEF	A + B + F (E) B + C(D) + E(F) B + C(D) + F(E) и другие A + B + C(D) + E + F
6	Тот же, не содержащий типы ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемые по 1—5-му вариантам опыта	Моновалентная типа D Моновалентная типа G Поливалентная типов A, B, C, D, E, F	D(C) G (A + B + C + D + E + F + G) и другие комбинации, в соответствии с комбинациями использованной сыворотки

Примечания:

1. Исследование начинают с использования комбинации с наибольшим количеством типов сывороток, и в случае, если использованная комбинация типов сывороток защищает мышей от гибели, типируют ботулинические токсины моно-, би- или трехвалентными сыворотками, указанными в соответствующем варианте опыта.

2. В скобках указана возможная перекрестная реакция при типировании ботулинических токсинов.

вышеописанному методу с тем, чтобы избежать гибели животных от прокипяченной жидкости или подтвердить, что клинические признаки гибели животных по всем вариантам опыта не соответствуют признакам ботулинической интоксикации.

При наличии в исходной жидкости ботулинических токсинов все последующие исследования проводят с необработанной жидкостью (ИЖ); ботулинических протоксинов — с жидкостью, обработанной протеолитическим ферментом (ИЖТ).

5.2. Определение титра ботулинического токсина

5.2.1. Для определения титра ботулинического токсина используют исходную жидкость, содержащую ботулинический токсин, или ту же жидкость, содержащую протоксин и обработанную непосредственно перед поставкой биологической пробы протеолитическим ферментом. Пипеткой с резиновой грушей по 1 $см^3$ исходной жидкости или жидкости, обработанной протеолитическим ферментом переносят в две пробирки; в одну стерильной пипеткой добавляют 1 $см^3$, получая разведение 1 : 1, в другую — 9 $см^3$ буферного желатино-фосфатного раствора, получая разведение 1 : 9. Из пробирки с жидкостью, разведенной в 10 раз, стерильной пипеткой с резиновой грушей отбирают 1 $см^3$ и переносят в третью пробирку, в которую стерильной пипеткой добавляют 9 $см^3$ раствора желатино-фосфатного буфера, получая разведение 1 : 99. При ограниченном объеме исходной жидкости из нее готовят те же разведения, но получают вышеуказанные соотношения между исходной жидкостью и желатино-фосфатным буфером, используя меньший объем исходной жидкости и раствора желатино-фосфатного буфера. С полученными разведениями исходной жидкости (или жидкости, обработанной протеолитическим ферментом) ставят биологические пробы в порядке, приведенном в табл. 1.

5.2.2. Опытным путем подбирают такие разведения исходной жидкости или жидкости, обработанной протеолитическим ферментом, при введении которых погибают все мыши, и последующие разведения, при которых мыши не погибают.

Если использование 10-кратных разведений не приводит к гибели всех мышей ни в одном из разведений, то для определения титра ботулинического токсина готовят 6- или 4-кратные разведения исходной жидкости или жидкости, обработанной протеолитическим ферментом. По наибольшему разведению жидкости, вызвавшему гибель всех мышей, вычисляют число мышиных MLD ботулинического токсина в 1 $см^3$ исходной жидкости с последующим пересчетом на продукт (приложение 1).

5.3. Серологическое типирование токсина C. botulinum

5.3.1. Подтверждение присутствия и установление типа ботулинического токсина защитным тестом

5.3.1.1. Присутствие ботулинического токсина в исходной жидкости обнаруживают путем постановки биологической пробы на мышах, защищенных иммунизацией противоботулиническими антитоксическими сыворотками типов A, B, E (и, если представляется возможным, типов C, D, F, G). Сыворотка типа C должна содержать антитоксины типов C_1 и C_2. Поливалентные сыворотки и типы поливалентных сывороток для опыта подбирают в зависимости от вида анализируемого продукта и предполагаемого типа ботулинического токсина в соответствии с комбинациями и порядком, приведенными в табл. 2 и 3.

5.3.1.2. Для типирования с помощью защитного теста используют противоботулинические антитоксические типоспецифические сыворотки, разведенные физиологическим раствором до концентрации 1 МЕ/см^3. Разведенные сыворотки хранят при температуре (4±2) °С в течение не более 10 сут.

Если при использовании сывороток, разбавленных до 1 МЕ/см^3, установить тип ботулинического токсина не удается, то биологическую пробу повторяют с сыворотками, разбавленными до концентрации 0,1 МЕ/см^3.

При использовании противоботулинических антитоксических типоспецифических сывороток, содержащих 1 МЕ/см^3, исходную жидкость (и/или исходную жидкость, обработанную протеолитическим ферментом) разводят буферным желатино-фосфатным раствором в соотношениях, позволяющих получить не менее трех последовательных разведений жидкости, содержащей в 10, 100 и 1000 раз меньше MLD, чем обнаружено в исходной жидкости.

5.3.1.3. При постановке защитного теста для типирования ботулинических токсинов каждому животному внутрибрюшинно вводят по 0,5 см^3 моновалентной, двух-, трех- или поливалентной сыворотки. Для инъекции одного типа сыворотки или их смеси каждой группе животных применяют отдельный шприц. Через 60 мин после введения сывороток животным вводят исходную жидкость, подготовленную по п. 5.3.1.2. Введение животным исходной жидкости начинают с наибольшего ее разведения, используя один шприц для группы мышей, получивших моновалентную сыворотку одного типа или двух-, трех- или поливалентную сыворотку, состоящую из одной комбинации моновалентных сывороток.

5.3.1.4. При наличии в исходной жидкости ботулинического токсина болеют и погибают с клиническими симптомами ботулинической интоксикации те мыши, которым введена сыворотка, не гомологичная типу ботулинического токсина в исходной жидкости. Погибают также мыши, которые получили гомологичную сыворотку в объеме, недостаточном для защиты от высокой дозы токсина. Мыши, получившие сыворотку, в состав которой входит моновалентная сыворотка, гомологичная типу ботулинического токсина в исходной жидкости, остаются живы. Если болеют и погибают все животные, то биологическую пробу повторяют, применяя более разбавленную исходную жидкость или ранее не использованные комбинации моновалентных сывороток.

5.3.2. Подтверждение присутствия и установление типа ботулинического токсина реакцией нейтрализации

Присутствие ботулинического токсина в исходной жидкости подтверждают реакцией нейтрализации с концентрированными противоботулиническими антитоксическими сыворотками в случаях, когда имеется для этого достаточное количество сывороток и исходная жидкость содержит более 4 мышиных MLD/см^3.

Допускается одновременное установление присутствия и типа ботулинического токсина, путем постановки развернутой реакции нейтрализации.

Концентрированные сыворотки применяют при необходимости с целью подтверждения присутствия ботулинических токсинов в исходной жидкости в наиболее короткий срок с наименьшим количеством животных без предварительного определения титра ботулинического токсина.

5.3.2.1. Для постановки реакции нейтрализации и типирования ботулинических токсинов концентрированными антитоксическими диагностическими противоботулиническими сыворотками используют сухие сыворотки, имеющие титр в пределах: для типа A — 200—440 МЕ; для типа B —100—200 МЕ; для типа E — 200—400 МЕ; по возможности реакция ставится с сыворотками типа C — 200—300 МЕ, типа F — 50 МЕ.

Непосредственно перед использованием ампулы с сухими сыворотками вскрывают, добавляют в каждую ампулу 1 см³ дистиллированной воды и, легко встряхивая, добиваются полного растворения сыворотки. Затем сыворотки типов A, B, C, E разводят в 10 раз, а сыворотки типа F — в 5 раз физиологическим раствором. Хранят при температуре (4±2) °С в течение не более 10 сут.

5.3.2.2. При использовании диагностических сывороток присутствие ботулинических токсинов в исходной жидкости или исходной жидкости, обработанной протеолитическим ферментом подтверждают реакцией нейтрализации. Для проведения реакции нейтрализации в чистую пробирку стерильной пипеткой с грушей переносят 2,4 см³ исходной жидкости или исходной жидкости, обработанной протеолитическим ферментом. Затем в нее вносят по 0,12 см³ сывороток пяти типов C. botulinum, или по 0,15 см³ сывороток четырех типов C. botulinum, или по 0,2 см³ трех типов C. botulinum. Каждый тип сыворотки отбирают для приготовления поливалентной сыворотки отдельной стерильной микропипеткой. После выдержки в течение 30—45 мин приготовленную смесь вводят по 1 см³ белым мышам. В случае гибели животных реакцию повторяют с исходной жидкостью или жидкостью, обработанной протеолитическим ферментом, разбавленной буферным желатино-фосфатным раствором в соотношении 1 : 9, а в случае необходимости — в большей степени. Результаты реакции оценивают по п. 5.3.1.4.

5.3.2.3. Для установления типа ботулинического токсина с помощью диагностических сывороток стерильной пипеткой с резиновой грушей по 2,4 см³ исходной жидкости или жидкости, обработанной протеолитическим ферментом, разливают в несколько пробирок, затем в каждую пробирку отдельными стерильными пипетками добавляют по 0,6 см³ моновалентных сывороток для типирования ботулинического токсина одного типа, по 0,3 см³ моновалентных сывороток для типирования смеси ботулинических токсинов двух типов и по 0,2 см³ моновалентных сывороток для типирования смеси ботулинических токсинов трех типов в соответствии с табл. 3.

В случаях, если необходимо избежать перекрестных неспецифических реакций с негомологичными сыворотками для разделения ботулинических токсинов типов E и F, C и D и других типов, концентрированные сыворотки разводят до концентрации 1 (0,1) МЕ/см³.

5.3.2.4. Для постановки развернутой реакции нейтрализации и типирования ботулинического токсина сыворотками после их разведения in vitro поступают следующим образом. В пробирку пипеткой с резиновой грушей переносят исходную жидкость или жидкость, обработанную протеолитическим ферментом и, при необходимости, готовят одной пипеткой в пробирках серию разведений этой жидкости в соотношении, подобранном по п. 5.2.1. Затем другой пипеткой с резиновой грушей последовательно, начиная с наибольшего разведения, переносят по 2,4 см³ из каждого разведения жидкости в серию из нескольких пробирок. Количество пробирок для каждого разведения соответствует числу типов моно-, двух-, трех- и поливалентных комбинаций сывороток, используемых в реакции нейтрализации и типировании ботулинических токсинов. В каждую серию пробирок с разведенной исходной жидкостью, начиная с наибольшего разведения, стерильной пипеткой добавляют по 0,6 см³ моно-, двух-, трех- или поливалентной сыворотки одного состава. Приготовленные смеси выдерживают в течение 30—45 мин при комнатной температуре. После окончания выдержки по 1 см³ смеси, отобранной от каждой пробирки, вводят двум белым мышам. Мыши, которые получили смеси, содержащие моно-, двух-, трех- или поливалентные сыворотки, гомологичные типу ботулинического токсина или нескольким типам ботулинического токсина, содержащегося в исходной жидкости, остаются живы; мыши, не получившие сыворотки гомологического типа, болеют и погибают с симптомами ботулинической интоксикации. Допускается одновременно подсчитывать титр токсина.

5.4. Выявление C. botulinum

5.4.1. Для выявления C. botulinum питательные среды для высева навесок продукта выбирают по табл. 4, используя одну из сред, предложенных для высева 1-й навески, и одну из сред, предложенных для высева 3-й навески.

Таблица 4

Схема посевов в питательные среды для выявления C. botulinum

Номер навески	Пищевой продукт	Питательная среда для посева	Обработка посевов	Температура термостатирования, °С
1	Любой, кроме консервов, при подозрении на присутствие вегетативных клеток C. botulinum типов A, B, C, D, F, разлагающих казеин	Печеночно-глицериновая; улучшенная клостридиальная; из вареного мяса; Китт-Тароцци; бульон с кониной и мальтозой	Без обработки	36±1
	Консервы	То же	То же	30±1
2	Любой, кроме консервов при подозрении на присутствие спор C. botulinum типов A, B, C, D, F, разлагающих казеин	»	Прогрев (60±1) °С или при (80±1) °С в течение 15 мин	36±1
	Консервы		То же	30±1
3	Любой при подозрении на присутствие C. botulinum типов B, C, D, E, F, не разлагающих казеин	Триптиказо-пептонно-глюкозная с дрожжевым экстрактом; питательная для определения стерильности; Хоттингера; бульон с кониной и мальтозой — с добавлением трипсина	Без обработки	30±1*
4	Любой, при подозрении на присутствие спор C. botulinum типов B, C, D, E, F, не разлагающих казеин; навеску продукта обрабатывают спиртом	То же, но без добавления трипсина	То же	30±1*

* При подозрении на присутствие психротрофных штаммов C. botulinum, посевы термостатируют при (26±1) °С.

Навески продукта вносят на дно сосуда с питательной средой. Одну из навесок обрабатывают перед посевом этиловым спиртом (96 % или абсолютным). Навеску смешивают с равным объемом спирта в колбе с притертой пробкой и, периодически встряхивая, выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. Навеску или осадок навески, обработанные спиртом, вносят в питательную среду. Посевы прогревают при температуре и в течение времени, приведенных в табл. 4, и помещают в термостат.

5.4.2. Посевы термостатируют, наблюдая за появлением признаков роста микроорганизмов до 14 сут. После появления признаков роста микроорганизмов посевы продолжают выдерживать в термостате 5 сут. Через 5 сут после появления роста микроорганизмов посевы переносят в холодильник и хранят при (4±2) °С.

Развитие C. botulinum в питательных средах начинается со дна пробирки, с помутнения среды, которое равномерно распространяется по всему столбику жидкости, иногда отступая от поверхности на 0,5—1,0 см, и сопровождается выделением пузырьков газа. Видимое газообразование может отсутствовать. Культуральная жидкость издает посторонний запах: гнилостный, сырный, масляно-кислый – от слабо выраженного до явного. С возрастом клетки C. botulinum частично лизируются, часто оседают на дно и помутнение среды исчезает.

Некоторые штаммы C. botulinum могут переваривать кусочки мяса. При развитии в смешанной культуре те или иные признаки, характеризующие присутствие в культуральной среде C. botulinum, могут отсутствовать.

Непосредственно после появления признаков роста микроорганизмов и затем на 3-е и 5-е сут из посевов отбирают пастеровской пипеткой со дна культуральную жидкость для окраски по Граму, окраски спор, фазово-контрастного микроскопирования и пробы на каталазу по ГОСТ 30425—97. В препаратах устанавливают морфологию бактерий, отмечают наличие типичных клостридиальных клеток, наличие и относительную интенсивность спорообразования и место локализации спор внутри клеток. За 18—24 ч культура C. botulinum образует грамположительные палочки с закругленными концами различной длины и ширины (приложение 1). При старении культуры в ней появляются клетки, не окрашивающиеся по Граму, и спорообразующие клетки обычно в виде ракеток и отдельные споры. Возбудители ботулизма в чистой культуре каталазу не образуют.

После появления признаков роста микроорганизмов пятидневную культуральную жидкость из всех посевов одновременно или последовательно исследуют на присутствие ботулинических токсинов и ботулинических протоксинов по п. 5.1.

Исследование начинают с тех посевов, в которых признаки развития C. botulinum выражены наиболее четко; исследование прекращают при обнаружении ботулинического токсина или ботулинического протоксина хотя бы в одном из посевов. В случае необходимости допускается начинать исследование культуральной жидкости раньше, но заключение об отсутствии ботулинического токсина может быть дано только на основании исследования пятидневной культуры.

Обнаружение в культуральной жидкости ботулинического токсина или протоксина и клостридиальных клеток указывает на присутствие в посеве токсигенного штамма C. botulinum. Устанавливают тип обнаруженного токсина или протоксина и тем самым тип C. botulinum, присутствующего в посеве.

5.5. Выделение культур токсигенных штаммов C. botulinum

5.5.1. Выделение культур токсигенных штаммов C. botulinum проводят при получении нечетких результатов по нейтрализации и (или типировании ботулинических токсинов в исходной жидкости).

5.5.2. Культуру токсигенных штаммов C. botulinum выделяют одновременно с (или после) обнаружением ботулинического токсина и (или) мезофильных клостридий в продукте или в культуральной жидкости. Для выделения отбирают те части продукта или те посевы, в которых обнаружены спорообразующие клостридиальные клетки и в которых спорообразование протекало наиболее интенсивно.

Жидкую фазу продукта или экстракт из продукта или культуральную жидкость отбирают пастеровской пипеткой из толщи продукта или со дна пробирки или флакона и по 1—2 $см^3$ переносят в три стерильные пробирки: продукт или культуральная жидкость первой пробирки предназначены для непосредственного высева на плотные питательные среды, второй — для высева после предварительного прогрева, третьей — для высева после обработки спиртом.

Содержимое второй пробирки прогревают при (60±1) °С или при (80±1) °С в течение 15 мин.

Содержимое третьей пробирки смешивают с равным объемом спирта, укупоривая пробирку так, чтобы во время выдержки спиртовой смеси спирт не улетучивался из пробирки.

5.5.3. Для выделения токсигенных штаммов C. botulinum применяют печеночно-желточный агар, желточный агар для анаэробов или агар кровяной с глюкозой или питательный агар с яичным желтком и лактозой. Продукт или культуральную жидкость отбирают из пробирок пастеровской пипеткой, наносят каплю на поверхность среды и втирают в нее шпателем, получая изолированные колонии. Для этого одним шпателем последовательно засевают три-четыре чашки Петри, перенося посевной материал шпателем из одной чашки в другую. Чашки с посевами термостатируют при (30±1) °С — (36±1) °С в течение 48 ч в анаэробных условиях по ГОСТ 30425—97.

5.5.4. На поверхности плотных сред C. botulinum образует выпуклые или плоские, гладкие или шероховатые, обычно немного расплывчатые колонии с ровными или разрезанными краями. На печеночно-желточном агаре колонии окружены «жемчужной» зоной (кроме типа G), которая повторяет контур колоний; кроме этого, колонии C. botulinum типов A и B имеют обычно узкую, до 2 мм, зону преципитации, типов C, D, E широкую до 4 мм, зону преципитации. На сахарно-кровяном агаре колонии C. botulinum типов A, B, C, D, E, F окружены зоной β-гемолиза. C. botulinum типа G гемолиза не дает.

Для подтверждения принадлежности выделенных колоний к клостридиям определяют отсутствие каталазы по ГОСТ 30425—97.

Бактериологической петлей из 5—10 колоний, имеющих характерные для C. botulinum свойства, отбирают посевной материал и переносят его соответственно в 5—10 пробирок с питательными средами, посевы термостатируют, устанавливают присутствие в них и тип C. botulinum.

6. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1. Если при проведении биологической пробы хотя бы одна из особей мышей, получившая жидкий продукт, жидкую фракцию или экстракт из продукта, заболела с проявлением клинических симптомов, характерных для ботулинической интоксикации, и остались живы мыши, получившие прокипяченный жидкий продукт, прокипяченную жидкую фракцию или прокипяченный экстракт из продукта, то считают, что в продукте содержится ботулинический токсин.

6.2. Если после предварительной обработки протеолитическим ферментом обнаружен токсин или его количество в продукте увеличилось, то считают, что в продукте содержится ботулинический протоксин.

6.3. Если при проведении биологической пробы все мыши остаются живы, то считают, что ботулинические токсины и протоксины в навеске проанализированного продукта содержатся в количестве менее X-MLD (где X-MLD – минимальное количество токсина, которое можно обнаружить в анализируемом продукте), или отсутствуют.

6.4. Если мыши погибли ранее, чем через 2 ч после постановки биологической пробы с разведенной исходной жидкостью без проявления клинических симптомов ботулинической интоксикации, то указывают, что определить присутствие в анализируемом продукте ботулинического токсина по настоящему стандарту не представляется возможным.

6.5. Если в результате защитного теста или реакции нейтрализации ботулинических токсинов или протоксинов противоботулиническими антитоксическими сыворотками мыши, получившие при постановке биологической пробы только исходную жидкость продукта, а получившие исходную жидкость продукта с моновалентной или двух-, трех- или поливалентной сывороткой, остаются живы, то считают, что в продукте содержится один или несколько ботулинических токсинов или протоксинов.

6.6. Если нейтрализовать и/или типировать ботулинический токсин в продукте и/или в культуральной жидкости не удалось, то указывают, что при проведении биологической пробы мыши погибли с клиническими симптомами ботулинической интоксикации. При этом указывают также типы и концентрации использованных противоботулинических антитоксических сывороток, разведение продукта или культуральной жидкости и раствор, применяемый для получения экстракта продукта.

6.7. Если при типировании ботулинических токсинов или протоксинов мыши, получившие исходную жидкость продукта, погибли с клиническими симптомами ботулинической интоксикации и не погибли мыши, получившие исходную жидкость продукта с противоботулиническими антитоксическими типоспецифическими сыворотками, то считают, что в продукте присутствуют ботулинический токсин или смесь ботулинических токсинов тех типов, которым соответствует сыворотка, нейтрализовавшая токсин и предохранившая животных от гибели.

6.8. Если проводилось титрование ботулинического токсина, то указывают количество (титр) обнаруженного токсина в 1 $см^3$ или г продукта в единицах MLD.

6.9. При обнаружении в культуральной жидкости посева хотя бы в одной из навесок продукта клостридий и ботулинического токсина или протоксина считают, что в продукте присутствует токсигенный штамм C. botulinum

Результаты исследования ботулинического токсина в культуральной жидкости посева продукта оценивают аналогично исследованию ботулинических токсинов в продукте.

6.10. Если проводилось выделение токсигенных штаммов C. botulinum, то при обнаружении в посевах хотя бы одной колонии клостридий, способной образовывать ботулинический токсин или протоксин, считают, что в продукте присутствует токсигенный штамм C. botulinum.

При обнаружении в посевах колоний клостридий, не способных образовывать ботулинический токсин или протоксин, считают, что в продукте токсигенные штаммы C. botulinum отсутствуют. Результаты исследования ботулинического токсина в культуральной жидкости выделенного штамма оценивают аналогично исследованиям ботулинических токсинов в продукте.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Обязательное

ТЕРМИНЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В НАСТОЯЩЕМ СТАНДАРТЕ И ПОЯСНЕНИЯ К НИМ

Термин	Пояснение
Исходная жидкость (ИЖ)	Жидкий продукт или жидкая фаза продукта, или его водный экстракт, или его экстракт в физиологическом растворе, или культуральная жидкость анаэробных посевов, полученные путем отстаивания и центрифугирования и (или) фильтрования продукта в соответствии с настоящим стандартом для исследования ботулинических токсинов
Исходная жидкость, обработанная протеолитическим ферментом (ИЖТ)	Исходная жидкость, обработанная протеолитическим ферментом трипсином или панкреатином для обнаружения в ней ботулинических протоксинов и определения титра токсинов, полученных в результате такой обработки в соответствии с настоящим стандартом.
Ботулинические токсины типов A, B, C, D, E, F, G	Комплекс белковых веществ, содержащий высокомолекулярный нейротоксический белок, образуемый C. botulinum типами A, B, C, D, E, F, G, определяемый с помощью защитного теста или реакции нейтрализации с моно- или поливалентными специфическими антитоксическими сыворотками, и вызывающий заболевание человека, высших млекопитающих и птиц, протекающее с симптомами, характерными для ботулинической интоксикации
C. botulinum	Клостридии, подвижные палочки с закругленными концами, единичные, парные или в коротких цепочках, образующие овальные субтерминальные, иногда парацентральные споры, обычно вздувающие клетку в виде ракетки или слабо выраженного веретена. В молодой культуре грамположительные. Каталазоотрицательные. Образуют желатиназу; липазу, кроме типа G; способность сбраживать глюкозу, мальтозу и салицин варьируют. Лактозу, сахарозу, маннит не сбраживают, нитраты не редуцируют, индол не образуют. Углеводы сбраживают обычно с выделением кислоты и газа. Кислота при этом может нейтрализоваться NH_3, образующимся в процессе разложения C. botulinum азотсодержащих соединений
C. botulinum типы A, B, C, D, E, F, G	C. botulinum образующий токсин соответственно типов A, B, C, D, E, F, G
C. botulinum типы A, B, C, D, F, разлагающие казеин	C. botulinum, токсины которых нейтрализуются соответственно антитоксическими противоботулиническими сыворотками типов A, B, C, D, F. Клетки 0,8—1,3×4,4—8,6 мкм. Образуют споры без экзоспориума. Разлагают казеин. Сбраживают глюкозу, образуют H_2S. Салицин, мальтозу сбраживают вариабельно. Не образуют лецитиназу. Оптимальная температура для роста от 30 до 40 °С.
C. botulinum типы C, D, не разлагающие казеин	C. botulinum, токсины которых нейтрализуются соответственно антитоксическими противоботулиническими сыворотками типов C, D. Клетки размером 0,5—0,7×3,4—7,9 мкм. Образуют споры без экзоспориума. Сбраживают глюкозу, иногда мальтозу, салицин. H_2S не образуют. Оптимальная температура для роста от 30 до 37 °С. Некоторые штаммы образуют лецитиназу
C. botulinum типы B, E, F, не разлагающие казеин	C. botulinum, токсины которых нейтрализуются соответственно антитоксическими противоботулиническими сыворотками типов B, E, F. Клетки размером 0,3—0,7×3,4—7,5 мкм. C. botulinum типы E, F, образуют споры с экзоспориумом. Споры C. botulinum E имеют характерные подвески. Сбраживают глюкозу, иногда мальтозу. Отдельные штаммы образуют лецитиназу. Оптимальная температура для роста от 25 до 37 °С.

Термин	Пояснение
C. botulinum тип G, разлагающий казеин	C. botulinum, токсин которого нейтрализуется антитоксической противоботулинической сывороткой типа G. Клетки 1,3—1,9×1,6—9,4 мкм. Споры, как правило, не утолщают спорангий. Казеин расщепляется медленно и слабо. Сахара не сбраживает, лецитиназу, липазу не образует, гемолиза не дает. Образует H_2S. Оптимальная температура для роста от 30 до 37 °С.
Морфология колоний C. botulinum типы A, B, C, D, F, гидролизующие казеин, на агаре печеночном	Колонии d = 3—8 мм, округлые с ризоидными краями, плоские с вогнутой серединой, серые, тусклые или слегка блестящие, прозрачные с непрозрачной серединой. Растут одинаково как при наличии, так и в отсутствии сбраживаемых углеводов.
Морфология колоний C. botulinum типы B, E, F, не гидролизующие казеин, на агаре печеночном	Колонии мелкие и средние, d = 1—3 мм, круглые с неправильными выступающими краями, тусклые, полупрозрачные. В присутствии сбраживаемого углевода размер колоний существенно увеличивается
C. botulinum типы C, D, не гидролизующие казеин, на агаре печеночном	Колонии мелкие и средние, d = 1—3 мм, круглые с волнистыми краями, серовато-беловатые, гладкие, тусклые и прозрачные. Присутствие в средах сбраживаемых углеводов не влияет на их рост
C. botulinum тип G на агаре печеночном	Колонии очень мелкие, d = 0,5—1,5 мм, круглые с ровными краями, выпуклые, серые, гладкие, блестящие. Добавление в среду углеводов не влияет на морфологию колоний
Минимальная летальная доза — MLD для мыши	Минимальное количество токсина, вызывающее в течение 72 ч гибель всех белых мышей массой 15—20 г с характерными клиническими симптомами заболевания при внутрибрюшинном введении в биологическую пробу
Титр токсина в MLD в $см^3$ или г продукта	Количеество (титр) токсина в 1 г или $см^3$ продукта, культуральной жидкости или растворов, приготовленных из них, в MLD, вычисляют по формуле $$X = \frac{V \cdot 10_n}{V_1 \quad m}\left(\frac{V_{иж} + V_2}{V_{иж}}\right),$$ где 10_n — разведение исходной жидкости, взятое с обратным знаком; m — масса навески продукта, $см^3$ или г; V — объем жидкости, используемый для экстрагирования токсина, $см^3$; V_1 — объем жидкости, введенной каждой мыши, $см^3$; $V_{иж}$ — объем исходной жидкости, взятый для приготовления 6 или 4-х кратного разведения, $см^3$; V_2 — объем растворителя, взятый для приготовления 6 или 4-х кратного разведения исходной жидкости, $см^3$; МЕ — международная единица активности ботулинических антитоксинов, соответствующая определенному количеству моновалентной противоботулинической антитоксической сыворотки, способной нейтрализовать определенное количество гомологичного ботулинического токсина.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
Обязательное

ТЕХНИКА ПОСТАНОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

Количество белых мышей, необходимых для постановки биологической пробы, при постановке защитного теста, проведении реакции нейтрализации и при типировании ботулинических токсинов с разведенными типоспецифическими сыворотками, равняется числу разведений исходной жидкости (с учетом использования при низком титре ботулинического токсина исходной жидкости без разведения), умноженному на количество типов моновалентных двух-, трех- или поливалентных сывороток, применяемых для постановки защитного теста или реакции нейтрализации и типирования ботулинических токсинов в исследуемом продукте, и умноженному на количество мышей в каждом варианте опыта — обычно на две особи.

По клеткам или банкам рассаживают белых мышей, помещая не более двадцати мышей одного пола в каждую клетку или банку. Во время постановки опытов перераспределения мышей по клеткам не допускается.

При проведении биологической пробы надевают резиновые перчатки, указательным и большим пальцами левой руки захватывают кожу мыши на затылке, а хвост и левую заднюю лапу удерживают между ладонью, четвертым и пятым пальцами. При этом мышь держат головой вниз так, чтобы кишечник сместился книзу от места укола. Место укола обрабатывают спиртом. Правой рукой вводят иглу шприца в горизонтальном направлении между кожей и мышцами с левой стороны в задней трети живота, затем иглу слегка поворачивают в вертикальном направлении и осторожным движением продвигают вперед. Момент проникновения иглы в брюшную полость ощущают по исчезающему под рукой сопротивлению. После проникновения иглы в брюшную полость большим пальцем правой руки медленно нажимают поршень шприца и, следя за градуировкой на цилиндре, вводят определенное количество жидкости в брюшную полость. Затем иглу вынимают, животное метят и помещают в клетку для наблюдения.

Допускается ставить биологическую пробу на белых мышах с помощником, который фиксирует животных.

Мышей метят путем окрашивания их шерсти по определенной схеме раствором карболового фуксина, бриллиантового зеленого, раствором пикриновой кислоты либо фломастерами.

Одним цветом, основным (желательно красным) метят мышей с 1 по 9 номер.

Двумя цветами — красным и дополнительным — желтым или зеленым — метят мышей с двузначными номерами: с 10 до 99 включительно, причем десятки обозначают дополнительным цветом, а единицы — основным.

В зависимости от места окраски, пятна краски (желательно фуксина) соответствуют следующим условным номерам:

на левой передней лапе — 1, на левом боку — 2, на левой задней лапе — 3, на голове — 4, на спине — 5, у основания хвоста — 6, на правой передней лапе — 7, на правом боку — 8, на правой задней лапе — 9.

При комбинированной окраске двумя цветами разных мест получают любое двузначное число.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
Справочное

ПОДГОТОВКА ШПРИЦЕВ И ИГЛ К ИСПЫТАНИЮ

При отсутствии стерильных шприцев непосредственно перед использованием шприцы кипятят. Для этого в дистиллированную или мягкую воду (без примеси соды) при комнатной температуре погружают раздельно поршень и цилиндр. Воду постепенно доводят до кипения и кипятят детали шприцев не менее 20 мин.

Иглы кипятят отдельно. В канал иглы вводят мандрен, погружают ее в 0,3—1 %-ный водный раствор углекислого натрия, постепенно доводят до кипения и кипятят не менее 20 мин. Прокипяченные детали шприца и иглы охлаждают до комнатной температуры и собирают.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4
Справочное

ОТБОР ПРОБ ОТ ОСТАТКОВ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БОТУЛИНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ И *C.botulinum*

Пробы остатков продуктов, послуживших причиной отравления, отбирают в соответствии с указаниями органов здравоохранения. Если масса остатков продукта меньше 80—100 г, то от продукта отбирают 1—3 навески, массой не менее 1 г ($см^3$); если количество продукта, отобранного для исследования, составляет 1 г ($см^3$) и меньше, то из него готовят одну навеску.

gost.e-ecolog.ru