ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 55291— 2012

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Методы микробиологического анализа

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации – ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1479-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.−2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети интернет (gost.ru)

© Стандартинформ, 2014

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Методы микробиологического анализа

Probiotic medicine remedies for veterinary use.
Methods of microbiological analysis

Дата введения—2014—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пробиотические лекарственные средства для ветеринарного применения, а также пробиотические кормовые добавки, закваски и молочные сыворотки, вырабатываемые из отходов молочной промышленности, содержащих пробиотические микроорганизмы, и устанавливает методы микробиологического анализа.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 52684–2006 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ Р 52833–2007 Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения

ГОСТ Р 53228–2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 53396–2009 Сахар белый. Технические условия

ГОСТ Р 54065–2010 Средства лекарственные для ветеринарного применения пробиотические. Методы определения пробиотических микроорганизмов

ГОСТ ISO 7218–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 4919.1–77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов

ГОСТ 6038–79 Реактивы. *D*–глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6672–75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9284–75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 10444.11–89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 10444.12–88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 10929–76 Реактивы. Водорода пероксид. Технические условия

ГОСТ ISO 11133-1–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть I Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории

ГОСТ ISO 11133-2–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред

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

ГОСТ 17206–96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 20730–75 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

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

ГОСТ 28085–89 Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности

ГОСТ 29112–91 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29230–91 (ИСО 835-4–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ 31654–2012 Яйца куриные пищевые. Технические условия

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте использованы следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **средства лекарственные пробиотические:** Лекарственные средства, содержащие в своем составе живые пробиотические микроорганизмы и применяемые для профилактики и лечения болезней, связанных с нарушением функций нормальной микрофлоры.

3.1.2 **добавка кормовая пробиотическая:** Кормовая добавка, содержащая в своем составе пробиотические микроорганизмы.

3.1.3 **посевы бактериологические:** Нанесение (внесение) пипеткой или другим инструментом материала, содержащего микроорганизмы на (в) питательные среды в целях выделения чистой культуры и определения ее морфологических свойств.

3.1.4 **колонии микроорганизмов:** Видимые невооруженным глазом скопления бактерий или других микроорганизмов на поверхности или в толще плотной питательной среды.

3.1.5 **культивирование:** Методы выращивания микроорганизмов при определенных условиях.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов;

КОЕ – колониеобразующая единица;

ТТХ – 2-, 3-,5- трифенилтетразолий хлорид;

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

4 Общие положения

4.1 Общие требования проведения микробиологического анализа – по ГОСТ ISO 7218.

4.2 Требования безопасности

Требования безопасности при работе с микроорганизмами – по [1], [2]; с химическими реактивами – по ГОСТ 12.1.007; с электрооборудованием – по ГОСТ Р 12.1.019.

Требования пожарной безопасности – по ГОСТ 12.1.004.

4.3 Требования к персоналу – по ГОСТ ISO 7218.

5 Аппаратура, материалы, посуда, реактивы и культуральные среды

5.1 Для проведения испытаний применяют аппаратуру, материалы, реактивы по ГОСТ Р 54065, а также:

- автоклав по ГОСТ ISO 7218;
- весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 II класса точности наибольшим пределом взвешивания 200 г (для взвешивания реактивов), с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,01 мг;
- дозатор питательных сред и реактивов по ГОСТ ISO 7218;
- колбы различной вместимости по ГОСТ 25336;
- шкаф ламинарный II класса биологической безопасности;
- посуду одноразового использования для микробиологических исследований по ГОСТ ISO 7218;
- петлю бактериологическую;
- пипетки градуированные по ГОСТ 29230;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 25336;
- прибор для подсчета колоний по ГОСТ ISO 7218;
- pH-метр с точностью калибровки ± 0,1 ед. pH при температуре от 20 °С до 25 °С по ГОСТ ISO 7218;
- стекла предметные по ГОСТ 9284;
- стекла покровные по ГОСТ 6672;
- флаконы темного стекла с притертыми пробками;
- шкаф сушильный по ГОСТ ISO 7218;
- термостат электрический для культивирования микроорганизмов с автоматическим терморегулятором, обеспечивающим поддержание температуры от 20 °С до 55 °С по ГОСТ ISO 7218;
- парафенилендиамингидрохлорид;
- экстракт мясной;
- лактозу;
- железа (III) гидрат;
- эскумин;
- полимиксина М сульфат;
- полимиксина В сульфат;
- кислоту молочную;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- яйца куриные по ГОСТ 31654;
- сахар белый по ГОСТ Р 53396;
- молоко стерильное обезжиренное;
- плазму кроличью;
- α–нафтол;
- *D*–глюкозу по ГОСТ 6038;
- пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805;
- ТТХ;
- водорода пероксид по ГОСТ 10929;
- раствор пероксида водорода массовой долей 10 % по ГОСТ Р 54065;
- раствор соляной кислоты массовой долей 5 % по ГОСТ Р 54065;
- раствор натрия гидроксида массовой долей 50 г/дм^3 по ГОСТ Р 54065;
- раствор массовой долей теллурита калия 20 г/дм^3 по ГОСТ Р 54065;
- раствор массовой долей метиленового синего 10 г/дм^3 по ГОСТ 54065 и ГОСТ 4919.1;
- раствор спиртовой массовой долей бромтимолового синего 16 г/дм^3 по ГОСТ Р 54065 и ГОСТ 4919.1;
- раствор кристаллического фиолетового по ГОСТ Р 54065 и ГОСТ 4919.1;
- раствор щелочной бромкрезолового пурпурного массовой долей 10 г/дм^3 по ГОСТ Р 54065 и ГОСТ 4919.1;
- раствор натрия азида массовой долей 100 г/дм^3 по ГОСТ Р 54065;
- раствор генцианвиолета или кристаллического фиолетового, или метилового фиолетового массовой долей 10 г/дм^3 по ГОСТ Р 54065 и 4919.1;
- раствор антибиотиков по ГОСТ 10444.12;
- раствор натрия хлорида 0,9 %-ный изотонический по [3];
- реактивы для окраски по Граму по ГОСТ ISO 7218;
- реактив для определения цитохромов по ГОСТ 10444.11;
- бриллиантовый зеленый;

- феноловый красный;
- бусы стеклянные;
- дрожжевой экстракт;
- N-ацетилпиридиний хлорид;
- EDTA;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- среды для культивирования бактерий семейства Enterobacteriaceae, в том числе бактерий рода Proteus:

цитратный агар Симмонса по прописи, указанной на этикетке;
среда Эндо по прописи, указанной на этикетке;
мясо-пептонный агар (МПА) по ГОСТ 29112;
висмут-сульфитный агар по прописи, указанной на этикетке;
агар Плоскирева по прописи, указанной на этикетке;
агар с эозином и метиленовым голубым (Левина) по прописи, указанной на этикетке;
агар лактозный с бриллиантовым зеленым и феноловым красным по 7.4.1;

- среды для культивирования бактерий семейства энтерококков Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium:

селективный агар по Сланецу и Бертли по 7.4.2;
канамицин азидно-эскулиновый агар (КАЭ-агар) по 7.4.3;
щелочная полимиксиновая среда по 7.4.4;
молочно-ингибиторная среда (МИС) по 7.4.5;

- среды для культивирования осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов:

среда агаризованная для выделения дрожжей по ГОСТ Р 54065;
солодовое агаризованное сусло с сахарозой по 7.4.6;
среда Сабуро по ГОСТ 28085;

- среды для культивирования бактерий рода Staphylococcus:

солевой агар с ТТХ по 7.4.7;
агар Байрд-Паркера по 7.4.8;
желточно-солевой агар (ЖСА) по 7.4.9;
молочно-желточный солевой агар (МЖСА) по 7.4.10;

- среда для культивирования бактерий рода Pseudomonas по 7.4.11;
- среда для определения КМАФАнМ по 7.4.12.

5.2 Допускается в качестве экспресс-методов выявления микроорганизмов и/или подтверждения их принадлежности к тому или иному виду использование тест-систем в виде подложек или пластин, содержащих набор питательных веществ и герметично закрытых непроницаемой мембраной; иммунохроматографических экспресс-тестов; бактериологических анализаторов (например, основанных на принципе импеданса); метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) по ГОСТ Р 52833. Проведение анализа и учет результатов с использованием таких методов проводят по инструкции производителя.

5.3 Допускается использовать готовые и сухие (дегидратированные) культуральные питательные среды по характеристикам и качеству не ниже указанных.

5.4 Инструменты и поверхность приборов, непосредственно соприкасающихся с анализируемыми образцами, должны быть простерилизованы в соответствии с [4].

5.5 Допускается применять средства измерений, аппаратуру, посуду, материалы и реактивы по метрологическим, техническим характеристикам и качеству не ниже вышеуказанных.

6 Сущность метода

Метод основан на определении посторонних микроорганизмов и грибов при высеве определенного количества пробиотических лекарственных средств (пробиотических кормовых добавок, заквасок, молочных сывороток) для ветеринарного применения и (или) их разведений в жидкие или агаризованные селективные питательные среды и, при необходимости, определении морфологических и биохимических свойств обнаруженных микроорганизмов и грибов и их подсчете.

7 Подготовка к проведению анализа

7.1 Подготовка посуды и материалов – по ГОСТ ISO 7218.

7.2 Отбор и подготовка проб – по ГОСТ Р 52684, ГОСТ Р 54065 и ГОСТ ISO 7218.

7.3 Приготовление растворов реактивов и индикаторов

7.3.1 Приготовление раствора N, N, N′, N, -тетраметил-пара-фенилендиамина дигидрохлорида массовой долей 10 г/дм^3

1 г реактива переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят холодной дистиллированной водой до метки.

Реактив готовят непосредственно перед применением.

7.3.2 Приготовление раствора ТТХ массовой долей 10 г/дм^3

1 г ТТХ переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят дистиллированной водой до метки и стерилизуют методом мембранной фильтрации.

Срок хранения раствора в темной плотно закрытой посуде при температуре (4 ± 2) °С – не более 3 мес.

7.4 Приготовление питательных сред

Приготовление питательных сред и их проверка перед использованием должны соответствовать требованиям ГОСТ ISO 11133-1 и ГОСТ ISO 11133-2.

Подготовка питательных сред перед использованием – по ГОСТ Р 54065.

7.4.1 Агар лактозный с бриллиантовым зеленым и феноловым красным

3,0 г мясного экстракта, 10,0 г пептона, 10,0 г лактозы, 5,0 г хлористого натрия, 0,5 г фосфорнокислого двузамещенного калия, 15,0 г агар-агара переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой. Допускается использовать мясо-пептонный бульон по ГОСТ 20730. Смесь нагревают до полного растворения компонентов, охлаждают до температуры 45° С – 55° С, устанавливают значение pH (7,2 ± 0,1) при температуре 25 °С. Среду стерилизуют в течение 20 мин при температуре (115 ± 1) °С, затем охлаждают до температуры 45 °С – 55 °С, и добавляют 40 см^3 раствора фенолового красного и 2 см^3 раствора бриллиантового зеленого, тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри, колбы или флаконы.

7.4.2 Селективный агар по Сланецу и Бертли

20,0 г пептона, 25,0 см^3 дрожжевого экстракта, 2,0 г *D*-глюкозы, 4,0 г калия фосфорнокислого двузамещенного, (15,0 ± 3,0) г агар-агара помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доливают дистиллированной водой до метки, нагревают до полного растворения компонентов. Охлаждают и устанавливают (7,2 ± 0,1) ед. pH. Стерилизуют текучим паром при температуре 100 °С в течение 30 мин, охлаждают до температуры 50 °С. Добавляют из расчета на 100 см^3 среды: азида натрия – 0,04 г, 1 %-ного водного раствора 2-, 3-,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) – 1 см^3. Тщательно смешивают, разливают в стерильные чашки Петри по 20 – 25 см^3.

Срок хранения среды в холодильнике при температуре (4±2) °С – не более двух недель. Среду допускается готовить перед употреблением без стерилизации в автоклаве.

7.4.3 Канамицин азидно-эскулиновый агар (КАЭ-агар)

20,0 г пептона из казеина, 25,0 см^3 дрожжевого экстракта, 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г натрия лимоннокислого, 0,5 г железа (III)-аммония гидроцитрата, 1,0 г эскулина, (15,0 ± 3,0) г агара помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доливают дистиллированной водой до метки. Растворяют составные части при нагревании до температуры (55 ± 1) °С, затем охлаждают до температуры 25 °С и устанавливают значение pH таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло (7,1 ± 0,1) ед. pH. Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин, охлаждают до температуры 50 °С, добавляют 1,5 см^3 раствора азида натрия и 0,4 см^3 раствора канамицин сульфата массовой концентрации 50 г/дм^3 или 0,2 см^3 раствора канамицин сульфата массовой концентрации 100 г/дм^3 и разливают по чашкам Петри.

Срок хранения среды при температуре (4 ± 2) °С – не более 7 сут.

7.4.4 Щелочная полимиксиновая среда

Основа среды: к 400 см^3 мясо-пептонного бульона по ГОСТ 20730 добавляют 5 г натрия хлорида, 10 г *D*-глюкозы, 10 см^3 дрожжевого экстракта. Основу среды стерилизуют при температуре (110 ± 1) °С в течение 12 мин, охлаждают и добавляют 250 см^3 раствора натрия карбоната массовой концентрации 21,2 г/дм^3 и 250 см^3 раствора бикарбоната натрия массовой концентрации 10 г/дм^3. Устанавливают значение pH при температуре 25 °С таким образом, чтобы оно составило (10,1 ± 0,1) ед. pH. После этого к среде добавляют 200 000 ЕД полимиксина М сульфата или полимиксина В сульфата, 5,0 см^3 спиртового раствора бромтимолового синего.

Срок хранения среды в защищенном от света и высыхания месте при температуре (4 ± 2) °С – не более 7 сут.

Непосредственно перед использованием среду разливают по 5 см^3 в стерильные пробирки. Растворы полимиксин В сульфата или полимиксин М сульфата готовят непосредственно перед использованием, для этого во флакон со стерильным антибиотиком по ГОСТ 10444.2 вносят 5 или 10 см^3 стерильной дистиллированной воды.

7.4.5 Молочно-ингибиторная среда (МИС)

К 850 см^3 расплавленного и охлажденного до температуры 50 °С мясо-пептонного агара, приготовленного по ГОСТ 10444.1, добавляют 150 см^3 обезжиренного молока , приготовленного по ГОСТ 10444.1, 12,5 см^3 раствора кристаллического фиолетового, 10,0 см^3 раствора калия теллурита массо-

вой концентрацией 20 г/дм^3, 200 000 ЕД полимиксина М сульфата или полимиксина В сульфата. Среду не стерилизуют, разливают в стерильные чашки Петри.

Допускается взамен раствора калия теллурита добавлять в среду 5,0 см^3 раствора 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлорида.

Срок хранения среды при температуре (4 ± 2) °С – не более 10 сут.

7.4.6 Солодовое агаризованное сусло с сахарозой

7.4.6.1 Приготовление солодового сусла с сахарозой: к 500 см^3 солодового сусла добавляют 420,0 г сахара по ГОСТ Р 53396, нагревая перемешивают до полного его растворения, фильтруют, охлаждают до температуры (50 ± 5) °С. Устанавливают с помощью молочной кислоты pH таким образом, чтобы при температуре 25 °С он составлял (3,6 ± 0,1) ед. pH. Сусло с сахарозой разливают по 60 см^3 в колбы и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

7.4.6.2 Приготовление агаризованного сусла: к 500 см^3 солодового сусла (3,6 ± 0,1) ед. pH добавляют 30,0 г агара, нагревают, при перемешивании расплавляют агар. Среду фильтруют и разливают по 40 см^3 в колбы, затем стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

7.4.6.3 Непосредственно перед посевом агаризованное сусло расплавляют на водяной бане, а солодовое сусло сахарозой нагревают до температуры (50 ± 5)°С и две эти части смешивают. Питательную среду разливают по 100 см^3 в колбы и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

Срок хранения готовой среды при температуре (4 ± 2) °С – не более 1 мес.

7.4.7 Солевой агар с ТТХ

Сухой питательный агар по прописи на этикетке и 65 г натрия хлорида расплавляют при нагревании в 1000 см^3 дистиллированной воды. Осадок отфильтровывают, разливают равномерно во флаконы, стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С 20 мин. Перед употреблением в расплавленную основу из расчета на 100 см^3 добавляют: 1 г *D*-глюкозы, 2 см^3 дрожжевого экстракта, 1 см^3 водного 1 %-ного раствора ТТХ. Тщательно перемешивают, разливают в чашки Петри.

Срок хранения среды при температуре (4 ± 2) °С – не более 14 сут.

7.4.8 Агар Байрд-Паркера

63,0 г порошка агара тщательно размешивают в 950 см^3 дистиллированной воды и кипятят до полного растворения частиц. Стерилизуют автоклавированием при температуре (120 ± 2) °С в течение 15 мин. К охлажденной до температуры 50 °С среде, в асептических условиях добавляют 50 см^3 концентрированной суспензии яичного желтка и 3 см^3 стерильного 3,5 %-ного раствора теллурита калия или 50 см^3 желточно-теллуритовой эмульсии. Тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Срок хранения среды в защищенном от света и высыхания месте при температуре (4 ± 2) °С – не более 14 сут.

7.4.9 Желточно-солевой агар (ЖСА)

Сухой питательный агар по прописи на этикетке и 65 г натрия хлорида растворяют при нагревании в 1000 см^3 дистиллированной воды, разливают равномерно в емкости, стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С в течение 20 мин. Перед употреблением в расплавленный и остуженный до температуры 50 °С – 55 °С солевой агар добавляют один стерильно приготовленный яичный желток, тщательно смешанный с 50 см^3 физиологического раствора с помощью стеклянных бус, перемешивают и разливают в чашки Петри тонким слоем.

Срок хранения среды в защищенном от света и высыхания месте при температуре (4 ± 2) °С – не более 14 сут.

7.4.10 Молочно-желточный солевой агар (МЖСА)

Основой среды является 1,8 %-ный питательный агар, содержащий 7,5 г натрия хлорида на 100 см^3 среды. К 200 см^3 растопленного и охлажденного до 50 °С агар-агара добавляют молочно-желточную смесь, которую готовят следующим образом: во флаконе с 20 см^3 стерильного обезжиренного молока эмульгируют (со стеклянными бусами) 2 см^3 яичного желтка. После добавления смеси в агар среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Готовая среда содержит 10 % стерильного обезжиренного молока и 1 % яичного желтка.

Срок хранения готовой среды при температуре (4 ± 2) °С – не более 14 сут.

7.4.11 Среда для культивирования бактерий рода Pseudomonas

К мясо-пептонному агару (МПА) добавляют 0,2 %-ного N-ацетилпиридиния хлорида, подавляющего рост посторонних микроорганизмов.

Для приготовления среды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 смешивают 20,0 г ферментативного сухого пептона, 7,0 г сернокислого калия, 1,5 г хлористого магния, 1,5 г сернокислого магния, 2,0 г N-ацетилпиридиния хлорида, 10,0 г агар-агара, доводят дистиллированной водой до метки, кипятят в течение 2 – 3 мин до расплавления агара, разливают в чашки Петри. Кислотность среды – (6,8 – 7,0) ед. pH.

Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 1 мес.

7.4.12 Среда для определения КМАФАнМ

Для приготовления среды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 смешивают 35,0 г сухого питательного агара, 2,5 г дрожжевого экстракта, 1,0 г *D*-глюкозы, доводят дистиллированной водой до метки, устанавливают 7,0 ед. pH и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин.

Срок хранения готовой среды при температуре (4 ± 2) °С – не более двух недель.

8 Методы посева и культивирования

8.1 Метод посева на твердые питательные среды в чашках Петри – по ГОСТ Р 54065 и ГОСТ ISO 7218.

8.2 Метод культивирования – по ГОСТ ISO 7218.

9 Основные методы идентификации микроорганизмов

9.1 Окрашивание по Граму проводят в соответствии с ГОСТ ISO 7218.

9.2 Проба на каталазу

Обнаружение каталазы, которая разлагает перекись водорода (H_2O_2) на воду и кислород, проводят, используя бульонную культуру или отдельную колонию на агаровой среде. Если в конкретных стандартах на методы анализа не установлены другие требования, то во всех случаях питательная среда не должна содержать кровь. Исключение составляет кровь, подвергшаяся термической обработке (среда с вареной кровью). В случае анаэробных бактерий перед добавлением перекиси (пероксида) водорода культуру выдерживают 30 с на открытом воздухе.

9.3 Проба на каталазу с колонией

На предметное стекло наносят отдельно две капли раствора перекиси (пероксида) водорода массовой долей 3 %. Отделяют колонию от среды стерильным стеклом или пластиковой палочкой (но не металлической иглой) и осторожно диспергируют ее в одной из капель. Немедленно, а также через несколько минут (но не менее 1 мин) отмечают отсутствие или образование пузырьков кислорода. В сомнительном случае покрывают обе капли предметным стеклом и сравнивают наличие пузырьков в обеих каплях. Наблюдения проводят визуально или с помощью микроскопа при малом увеличении.

9.4 Проба на оксидазу

9.4.1 Обнаружение оксидазы проводят по окрашиванию компонентов вследствие окисления N, N, N', N'-тетраметил-пара-фенилендиамина дигидрохлорида под действием фермента.

9.4.2 Проведение анализа и интерпретация результатов

Увлажняют кусок фильтрованной бумаги раствором по 7.3.1. Отбирают пробу бактериальной культуры с агаровой среды, на которой ее выращивали, с помощью платиновой иглы, стеклянной или пластиковой палочки (никель-хромовая игла дает ошибочные положительные результаты). Пробу помещают на увлажненную фильтрованную бумагу.

В случае присутствия оксидазы через 5–10 с появляется окрашивание от фиолетового до пурпурного цвета. Если после 10 с цвет не изменился, проба на оксидазу считается отрицательной.

9.5 Проба на лецитиназу

Наличие или отсутствие лецитиназной активности определяют на желточно-солевом агаре (ЖСА). Пробу бактериальной культуры с агаровой среды с помощью стерильной платиновой петли пересевают на желточно-солевой агар. Культивируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24–48 ч. На плотной питательной среде вокруг колоний, вырабатывающих активную лецитиназу, просматривается широкая беловатая непрозрачная радужная зона.

9.6 Проба на коагулазу

9.6.1 Проба на коагулазу, используемая для идентификации патогенных стафилококков, основывается на выявлении бактериального фермента коагулазы, который разрушает фибриноген и растворяет сгустки крови. Используют сухую кроличью плазму промышленного производства с цитратом натрия или EDTA.

9.6.2 Проведение анализа и интерпретация результатов

9.6.2.1 Слайд-тест («хлопьеобразующий фактор»)

На стекло наносят одну каплю кроличьей плазмы, суспензируют в ней бактериальные колонии стафилококков и наблюдают за реакцией в течение 10 с.

Альтернативный способ: на стекле готовят густую суспензию культуры в дистиллированной воде, тщательно гомогенизируют, чтобы исключить спонтанное склеивание. Добавляют одну каплю кроличьей плазмы и, дополнительно не перемешивая, наблюдают за образованием хлопьев в течение 10 с.

При положительной реакции образуются хлопья, которые не смешиваются в однородную суспензию. При отрицательной реакции хлопья не образуются, и суспензия остается гомогенной. Эталонным штаммом служит тест-штамм Staphyloccocus aureus.

9.6.2.2 Пробирочный тест

Засевают изолированную колонию стафилококка в пробирку с 0,5 $см^3$ кроличьей плазмы. Пробирки с заранее разлитой кроличьей плазмой могут храниться в холодильнике до 10 сут или в замороженном состоянии до нескольких месяцев. Инкубируют при температуре 35 °С – 37 °С до 24 ч.

Первое наблюдение проводят через 4 ч инкубации на наличие желе или сгустка, который не разрушается при легком встряхивании.

Если сгусток появляется через 4 ч, пробирки оставляют до следующего утра при комнатной температуре, чтобы избежать его растворения за счет стрептокиназоподобной активности анализируемой культуры стафилококка.

Если сгусток отсутствует, посевы инкубируют повторно в течение 24 ч и затем анализируют повторно.

При наличии патогенных стафилококков наблюдается положительный результат – любое образование сгустка через 4 или 24 ч. При отрицательном результате сгусток не образуется, плазма свободно растекается при наклоне пробирки, то есть патогенные стафилококки отсутствуют.

10 Методы выявления бактерий и грибов

10.1 Метод выявления бактерий рода Proteus

10.1.1 Проведение анализа

Для выявления бактерий рода Proteus в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке) анализируемую пробу или его исходное разведение высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред: цитратного агара Симмонса, среды Эндо, мясо-пептонного агара по ГОСТ 29112, висмут-сульфитного агара, агара Плоскирева, агара с эозином и метиленовым голубым (агар Левина), лактозного агара с бриллиантовым зеленым и феноловым красным по 7.4.1.

Для получения чистых культур Proteus используют посев по Шукевичу (в конденсационную жидкость скошенного питательного агара).

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч – окончательный.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Proteus.

Бактерии рода Proteus на средах образуют белые роящиеся колонии. На среде Плоскирева образуют крупные диаметром 2–3 мм полупрозрачные изолированные колонии правильных очертаний с желтовато-розоватым оттенком. На висмут-сульфитном агаре через 48 ч культивирования колонии бактерий рода Proteus имеют грязно-коричневый цвет, а после их снятия на среде остается темно-коричневая зона.

При необходимости идентификации из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1 и делают пробу на каталазу по 9.2. В мазках, окрашенных по Граму, бактерии рода Proteus имеют форму палочек размером 1,0 – 3,0 × 0,4 – 0,6 мкм; кокковидные или неправильные инволюционные форм, грамотрицательные. Клетки могут образовывать пары или цепочки, капсул не образуют. Все представители рода Proteus каталазоположительные.

10.1.2 Обработка результатов

Результаты оценивают визуально по каждой анализируемой пробе отдельно.

Если при анализе культуральных и морфологических свойств обнаружены каталазоположительные грамположительные микроорганизмы, дающие на пластинчатых средах характерный рост в виде роящихся колоний, то их относят к бактериям рода Proteus.

10.2 Метод выявления бактерий рода Pseudomonas

10.2.1 Проведение анализа

Для выявления бактерий рода Pseudomonas в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке) анализируемую пробу или его

исходное разведение высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред: по 7.4.11, мясо-пептонного агара, агара Плоскирева.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч – окончательный.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Pseudomonas.

Бактерии рода Pseudomonas образуют синие или зеленовато-синие или фиолетовые пигменты,

проникающие в субстрат.

При необходимости идентификации из выросших колоний готовят препараты и окрашивают по Граму по 9.1. В мазках, окрашенных по Граму, бактерии рода Pseudomonas представлены грамотрицательными палочками размером 1,5 – 3,0 × 0,4 – 0,6 мкм, располагающимися одиночно, парами или короткими цепочками, не образующими спор, но продуцирующими слизь, окружающую микробную клетку тонким слоем.

10.2.2 Обработка результатов

Результаты оценивают визуально по каждой анализируемой пробе отдельно.

Если при анализе культуральных и морфологических свойств обнаружены каталазоположительные грамотрицательные микроорганизмы, дающие на пластинчатых средах характерный рост в виде колоний, образующих синий, зеленовато-синий или фиолетовый пигмент, то их относят к бактериям рода Pseudomonas.

10.3 Метод выявления бактерий рода Staphylococcus

10.3.1 Проведение анализа

Метод основан на способности микроорганизмов рода Staphylococcus расти на питательных средах с повышенным содержанием хлорида натрия.

Для выявления бактерий рода Staphylococcus в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке) анализируемую пробу или его исходное разведение высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред по 7.4.7–7.4.10.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч – окончательный.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Staphylococcus.

При необходимости идентификации из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1 и делают пробу на каталазу по 9.2 и (или) коагулазу по 9.6. В мазках, окрашенных по Граму, стафилококки располагаются поодиночке, парами или в виде скоплений (гроздей) грамположительных кокков неправильной формы. Размеры микробных клеток у стафилококков 0,5 – 1,5 мкм. Стафилококки относятся к каталазоположительным микроорганизмам.

10.3.2 Обработка результатов

Результаты оценивают визуально по каждой анализируемой пробе отдельно.

Если при анализе культуральных и морфологических свойств обнаружены каталазоположительные грамположительные микроорганизмы, дающие на пластинчатых селективных средах характерный рост в виде колоний от белого до золотисто-желтого цвета, располагающиеся в мазках, окрашенных по Граму, в виде овоидных клеток, собранных парами или скоплениями, то их относят к бактериям рода Staphylococcus.

Если на средах обнаружены каталазоположительные светло-желтые или золотистые колонии, образующие зону преципитации и зону плазмокоагуляции, а в мазках, окрашенных по Граму, выявлены овоидные клетки, собранные парами или скоплениями, то их относят к бактериям рода Staphylococcus, виду S. aureus.

10.4 Метод выявления бактерий рода Enterococcus (Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium)

10.4.1 Проведение анализа

Для выявления бактерий рода Enterococcus в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке) анализируемую пробу или его исходное разведение высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред по 7.4.2 – 7.4.5.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч – окончательный.

После инкубирования посевов, проведенного по 8.1, учитывают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных для энтерококков колоний:

- на селективном агаре по Сланецу и Бертли колонии энтерококков –красно-розовые или карминовые с коричневым оттенком с узким беловатым ободком диаметром до 2 мм;

- канамицин азидно-эскулиновом агаре колонии энтерококков –оливково-зеленые до темно-коричнево-черных с равномерной окраской поля;

- молочно-ингибиторной среде:

с 2-, 3-,5-ТТХ – колонии вишнево-красные с зоной протеолиза или бесцветные с розовым центром;

с теллуритом калия – колонии, окрашенные в черный цвет.

Посевы через 24 – 48 ч инкубирования просматривают и отмечают рост колоний характерных

для энтерококков.

При необходимости идентификации из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1. Энтерококки - грамположительные кокки, расположенные парами, короткими или длинными цепочками.

Наличие каталазы определяют по 9.2. Энтерококки каталазу не образуют.

10.4.2 Обработка результатов

Результаты оценивают визуально по каждой анализируемой пробе отдельно.

Если при анализе культуральных и морфологических свойств микроорганизмов обнаружены грамположительные, не образующие каталазу кокки, то делают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относят к энтерококкам.

10.5 Метод выявления осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов

10.5.1 Проведение анализа

Для выявления осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке) анализируемую пробу или его исходное разведение высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред по 7.4.6, агаризованной среды для выделения дрожжей по ГОСТ Р 54065 и среды Сабуро.

Посевы инкубируют в течение 7 сут при температуре (24 ± 1) °С. Через трое суток проводят предварительную оценку результатов инкубирования посевов, а через 7 сут – окончательную.

10.5.2 Обработка результатов

Для определения количества осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов выбирают те разведения, при посеве которых на чашках Петри вырастает не менее 15 и не более 150 колоний для дрожжей и не менее 5 и не более 50 для плесневых грибов.

Колонии осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов разделяют визуально.

Рост осмотолерантных дрожжей на агаризованных питательных средах сопровождается образованием выпуклых, блестящих, серовато-белых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем.

Рост осмотолерантных плесневых грибов на питательных средах сопровождается появлением мицелия различной окраски.

10.6 Методы выявления бактерий семейства Enterobacteriaceae

Колиформные бактерии – грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч. При микробиологическом контроле пробиотических препаратов, микробиологических кормовых добавок, можно ограничиваться обнаружением бактерий из группы кишечной палочки без их биохимической дифференциации.

10.6.1 Проведение анализа

Для выявления колиформных бактерий семейства Enterobacteriaceae в анализируемом препарате (пробиотической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке) анализируемую пробу его исходное разведение высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред по 7.4.1, цитратного агара Симмонса, среды Эндо, мясопептонного агара, висмут-сульфитного агара, агара Плоскирева, агара Левина. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч и проводят предварительный учет результатов, окончательный учет проводят через (48 ± 3) ч.

Посевы на агаризованных средах после инкубирования просматривают и отмечают рост характерных колоний. Они могут быть окрашены в красный цвет с наличием металлического блеска или без него (лактозоположительные энтеробактерии), бесцветными (лактозоотрицательные), могут приобретать розоватый или сероватый оттенок с более или менее выраженным темным центром, особенно у более крупных колоний. Диаметр и окраска колоний могут варьировать не только в

зависимости от родовой принадлежности, но и от массивности роста. В среднем диаметр колоний составляет 1–2 мм. Представители родов Klebsiella и Enterobacter чаще образуют слизистые розовые колонии диаметром 2–3 мм. Shigella, Salmonella, Hafnia – неройщиеся представители рода протеев обычно образуют более «нежные» колонии небольших размеров.

На лактозном агаре с бриллиантовым зеленым и феноловым красным колиформные бактерии образуют ярко-желтые колонии диаметром 2 – 4 мм с желтой прозрачной зоной диаметром 1–3 мм вокруг колонии.

На среде Эндо колонии бактерий семейства Enterobacteriaceae обычно выпуклые с правильными очертаниями (круга), в разной степени опалесцирующие, иногда слизистые, темно-красные с металлическим блеском или розово-красные без блеска, на агаре Плоскирева – кирпично-красные с глянцевой поверхностью, на среде Левина – черные с металлическим блеском, темные с черным центром, темно-фиолетовые или фиолетово-черные с темным центром блестящие колонии. Из колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму: при микроскопии обнаруживают грамотрицательные па-

лочки различной величины.

Бактерии рода Salmonella на висмут-сульфит агаре образуют колонии черные с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и с пигментированием среды под колонией; на среде Плоскирева – колонии бесцветные прозрачные, на среде Эндо – колонии круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные; на среде Левина – колонии прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые.

На среде Симмонса растут бактерии, способные усваивать цитратно-аммонийные соли с образованием синего цвета. К ним относят энтеробактерии родов Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella.

При необходимости подтверждения принадлежности выросших микроорганизмов к колиформным бактериям из чашек Петри с посевами отбирают не менее пяти колоний, из которых приготавливают мазки и окрашивают их по Граму.

Колиформные бактерии семейства Enterobacteriaceae являются грамотрицательными палочками.

При необходимости определяют наличие оксидазы по 9.4. Часть отдельной колонии наносят платиновой петлей или стеклянной палочкой на фильтровальную бумагу, смоченную в одном из реактивов.

При применении раствора N, N, N', N'-тетраметил-пара-фенилендиами-на дигидрохлорида положительная реакция проявляется появлением пурпурной окраски в течение 10 с.

При применении реактива на основе α-нафтола положительная реакция проявляется появлением синей окраски в течение 60 с.

Бактерии семейства Enterobacteriaceae не обладают активной оксидазой, поэтому изменения окраски не происходит.

10.6.2 Обработка результатов

К бактериям семейства Enterobacteriaceae относят аэробные и факультативно-анаэробные не образующие спор грамотрицательные палочки, не обладающие оксидазой.

Если при подтверждении характерных колоний в 80 % случаев, то есть не менее чем в четырех из пяти колоний подтвержден рост бактерий семейства Enterobacteriaceae, то считают, что все характерные колонии, выросшие на чашке Петри, принадлежат к этому семейству.

10.7 Метод определения общего числа мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

10.7.1 Проведение анализа

Для определения КМАФАнМ из каждой пробы пробиотического препарата (пробиотической кормовой добавки, закваски, молочной сыворотки) анализируемую пробу или его исходное разведение высевают в соответствии с 8.1 с таким расчетом, чтобы на каждой чашке выросло от 30 до 300 колоний.

Для определения общего числа КМАФАнМ в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке) анализируемую пробу или его соответствующее разведение вносят в две параллельные стерильные чашки Петри, после чего в каждую чашку вливают тонкий слой расплавленного остуженного до температуры (45 ± 1) °С питательного агара, приготовленного по 7.4.12. Для предотвращения роста на поверхности агара спорообразующих бактерий и бактерий рода Proteus в Н-форме рекомендуется наслоить расплавленный и охлажденный агар в количестве 1/3 объема первоначально внесенной в чашку среды. В результате образуется слой толщиной 3 – 4 мм.

10.7.2 Обработка результатов

При определении общего количества КМАФАнМ в 1 г (1 $см^3$) анализируемого пробиотического препарата (пробиотической кормовой добавке, молочной сыворотке) подсчитанное количество колоний умножают на степень разведения анализируемой пробы по каждой чашке и выводят среднеарифметическое результатов подсчета колоний в двух чашках.

11 Обработка результатов

11.1 Если анализ предполагает качественную оценку и искомые микроорганизмы обнаружены, результат выражают следующим образом:

- «Обнаружен», при этом указывают род микроорганизмов и разведение анализируемого препарата;

Если искомые микроорганизмы отсутствуют, результат выражают следующим образом:

- «Не обнаружен», при этом указывают род микроорганизмов и разведение анализируемого препарата.

11.2 Если анализ предполагает количественную оценку, и искомые микроорганизмы обнаружены, то количество искомых микроорганизмов X_1, КОЕ/г или КОЕ/см^3, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{NP}{V}, \quad (1)$$

где N – среднее количество колоний, выросших на чашках Петри из одного разведения;

V – объем разведения, использованного для проведения анализа, см^3;

P – степень разведения.

Далее результаты подсчета, полученные по каждому разведению, суммируют, делят на количество разведений и получают конечный результат – количество искомых микроорганизмов в 1 г (см^3) пробиотического лекарственного средства, микробиологической кормовой добавки, закваски или молочной сыворотки.

11.3 Посевы из жидких пробиотических препаратов не должны давать роста посторонней микрофлоры. При обнаружении роста посторонней микрофлоры или грибов, определения повторяют на удвоенном количестве проб пробиотического препарата (пробиотической кормовой добавки, молочной сыворотки). Данные повторного определения считают окончательными и распространяют на всю серию (партию).

При обнаружении роста посторонней микрофлоры в повторном определении серию (партию) препарата (пробиотической кормовой добавки, молочной сыворотки) считают не соответствующей требованиям нормативного документа на конкретный препарат (пробиотическую кормовую добавку, молочную сыворотку) и бракуют с последующей утилизацией.

11.4 В посевах из пастообразных и твердых (порошкообразных) препаратов допускается наличие сапрофитной микрофлоры в количестве не более 300000 КОЕ/г.

Не допускается наличие патогенной микрофлоры (бактерии рода Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosae, семейства Enterobacteriaceae).

Библиография

[1]	СП 1.2.036 — 95	Санитарные правила. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов III – IV групп патогенности
[2]	СП 1.3.2322 — 2008	Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней
[3]	Государственная Фармакопея, X издание	Раствор натрия хлорида 0,9 %-ный изотонический для инъекций, стр. 442
[4]	Государственная Фармакопея, XI издание	Стерилизация, стр. 19

УДК 619:615.355:636.087.8:006.354 ОКС 07.100.30
65.120

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, пробиотические лекарственные средства для ветеринарного применения, микробиологические кормовые добавки, закваски, молочные сыворотки, методы определения, методы идентификации, микробиологические методы

Подписано в печать 01.04.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 31экз. Зак. 1817

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru