ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 72491— 2025

КОРМА, КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОРМОВ

Методы микробиологического анализа

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2026

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

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 декабря 2025 г. № 1845-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». 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.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2026

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
4 Питательные среды и реактивы 4
5 Средства измерений, аппаратура, посуда, материалы, реагенты и тест-штаммы 5
6 Отбор и подготовка проб 6
7 Методы посева и культивирования 7
8 Основные методы идентификации микроорганизмов 7
9 Методы микробиологических испытаний 10
10 Ускоренные методы выделения микроорганизмов 20
Приложение А (рекомендуемое) Приготовление питательных сред из собственных ингредиентов 22
Приложение Б (рекомендуемое) Схема выявления бактерий рода *Salmonella* 23
Приложение В (рекомедуемое) Схема классификации Кауфмана и Уайта (сокращенная) 24
Приложение Г (рекомендуемое) Схема выявления энтеропатогенных типов бактерий вида *E. coli*. 26
Приложение Д (рекомедуемое) Патотипы эшерихий, которые вызывают различные заболевания (кишечные, септические и другие) у животных и человека 27
Приложение Е (рекомедуемое) Блок-схема ускоренного обнаружения бактерий рода *Salmonella* в кормах с использованием метода ПЦР 28
Приложение Ж (рекомедуемое) Культурально-морфологические свойства клостридий 29
Приложение И (рекомедуемое) Биохимические свойства этиологически значимых для животных видов клостридий 31

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА, КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОРМОВ

Методы микробиологического анализа

Feed, animal fodder additives, raw materials for feed production.
Methods of microbiological analysis

Дата введения — 2026—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма, кормовые добавки для животных, а также сырье для производства кормов и устанавливает методы микробиологического анализа.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6672 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9284 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

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

ГОСТ 10444.7 Продукты пищевые. Методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*

ГОСТ 10444.9 Продукты пищевые. Метод определения *Clostridium perfringens*

ГОСТ 10444.15 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ГОСТ 10852 Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 13496.0 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 13586.3 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 13979.0 Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 25311 Мука кормовая животного происхождения. Методы бактериологического анализа

ГОСТ 26670 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 28560 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов Proteus, Morganella, Providencia

ГОСТ 29185 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях

ГОСТ 31659 (ISO 6579-1:2017) Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод обнаружения, подсчета и серотипирования бактерий рода Salmonella. Часть 1. Обнаружение Salmonella spp.

ГОСТ 32011 (ISO 16654:2001) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения Escherichia coli O157

ГОСТ ISO 6887-1 Микробиология пищевой продукции и кормов. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологического исследования. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений

Издание официальное

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

ГОСТ ISO/TS 13136 Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов. Горизонтальный метод определения бактерий Escherichia coli, продуцирующих Шига-токсин, в том числе серогрупп O157, O111, O26, O103 и O145

ГОСТ ISO/TS 17728 Микробиология пищевой цепи. Методы отбора проб пищевой продукции и кормов для микробиологического анализа

ГОСТ ISO 20837 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Требования к подготовке образцов для качественного обнаружения

ГОСТ ISO 22119 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Общие требования и определения

ГОСТ Р 51426 Микробиология. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

ГОСТ Р 52833 (ИСО 22174:2005) Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ Р 59369 Корма для непродуктивных животных. Методы отбора проб

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 применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **бактерии рода *Salmonella*:** Грамотрицательные, подвижные (кроме *S.* pullorum, *S.* gallinarum) палочки с закругленными концами, оксидазоотрицательные, каталазоположительные, ферментирующие глюкозу с образованием кислоты и газа, не ферментирующие лактозу (кроме *S.* typhi), в основном образующие сероводород, не гидролизующие мочевину, не образующие ацетоин, индол и р-галактозидазу (кроме *S. arizona*), образующие L-лизиндекарбоксилазу (кроме *Salmonella* paratiphi A).

3.1.2 **бактерии рода *Proteus*:** Грамотрицательные палочки, обладающие свойством роения колоний при росте на влажной плотной питательной среде.

3.1.3 **биологическая проба** (биопроба): Процесс, основанный на заражении лабораторных животных различными способами: подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно и другими с целью идентификации микроорганизмов по вирулентности или воспроизведения и изучения инфекционного процесса и патологоанатомических изменений.

3.1.4 **энтеропатогенные типы бактерий вида *E. coli*:** Представители вида *Escherichia coli*, способные вызывать кишечные инфекции у животных и человека.

3.1.5 **диареегенные эшерихии:** Бактерии вида *E. coli*, относящиеся к патогруппам: энтеротоксигенные *E. coli* (ETEC); энтероинвазивные *E. coli* (EIEC); энтеропатогенные *E. coli* (EPEC); энтерогеморрагические *E. coli* (EHEC); энтероагрегативные (энтероагрегирующие, энтероадгезивные или энтероадгерентные) кишечные палочки (EAEC); диффузно-адгерентные (диффузно-агрегативные, диффузно-агрегирующие) *E.coli* (DAEC).

3.1.6 ***E. coli*, продуцирующие Шига-токсин (STEC):** Бактерии *E. coli*, имеющие гены, ответственные за синтез Шига-токсина, ген, ответственный за синтез интимина и относящиеся к серогруппам O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128, O145, O157.

3.1.7 ***E. coli*:** Грамотрицательные, оксидазоотрицательные бактерии, ферментирующие лактозу при температуре (44 ± 1) °С с образованием газа и образующие индол из триптофана, не образующие ацетоин и не утилизирующие цитрат, дающие положительную реакцию с метил-рот, ферментирующие глюкозу и сорбит.

3.1.8 **токсинообразующие анаэробы:** Грамположительные анаэробные спорообразующие бактерии семейства *Clostridiaceae* рода *Clostridium*, продуцирующие токсины.

3.1.9 **патогенные (токсинообразующие) бактерии рода *Clostridium*:** Группа спорообразующих анаэробных бактерий, способных вызывать тяжелые заболевания у животных за счет производства токсинов, включающая такие виды, как *Clostridium botulinum, Clostridium perfringens*.

3.1.10 ***Clostridium perfringens* (*C. perfringens*):** Крупные грамположительные палочки, неподвижные, спорообразующие, каталазоотрицательные, редуцирующие нитраты, ферментирующие лактозу и разжижающие желатин.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

БФЛС — сахарозо-лактозный агар с бриллиантовым зеленым и феноловым красным;

ВСА — висмут-сульфит агар;

ГРМ — гидролизат рыбной муки;

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЗПВ — забуференная пептонная вода;

МПА — мясо-пептонный агар;

МПБ — мясо-пептонный бульон;

МР — методические рекомендации;

МКТ — тетратионатный бульон Мюллер-Кауфмана;

ОСО — отраслевой стандартный образец;

ПЖА — полужидкий агар;

ПЦР — полимеразная цепная реакция;

РА — реакция агглютинации;

РН — реакция нейтрализации;

eae — гены интимина;

ETEC — *Escherichia coli*, продуцирующие термолабильный и термостабильный энтеротоксины;

LDC — L-Лизиндекарбоксилазная среда;

LT — термолабильный энтеротоксин;

MSRV — модифицированная полужидкая среда Раппопорта-Вассилиадиса;

SIM — полужидкая питательная среда для дифференциации энтеробактерий по признакам образования сероводорода, индола и подвижности;

ST — термостабильный энтеротоксин;

Stx — гены, ответственные за синтез Шига-токсина (используют также синоним — vtx);

STEC — *Escherichia coli*, продуцирующие Шига-токсин;

XLD — ксилозо-лизин-дезоксихолатный агар;

XLT4 — ксилозо- лизиновый агар с тергитолом 4;

VP — реакция Фогеса-Проскауэра.

4 Питательные среды и реактивы

4.1 Общие требования

4.1.1 Питательные среды для выделения бактерий рода *Salmonella*:
- забуференная пептонная вода (ЗПВ) — по ГОСТ 31659;
- среда Раппопорта-Вассилиадиса (RVS-бульон) — по ГОСТ 31659;
- MSRV-агар — по ГОСТ 31659;
- магниевая среда промышленного производства;
- тетратионатный бульон Мюллера-Кауфмана промышленного производства;
- селенитовая среда промышленного производства;
- ксилозо-лизиновый агар с дезоксихолатом (XLD) — по ГОСТ 31659;
- ксилозо-лизиновый агар с тергитолом 4 (XLT4) промышленного производства;
- висмут-сульфитный агар — по ГОСТ 31659;
- БФЛС-агар промышленного производства;
- агар с бриллиантовым зеленым (Brilliant Green Agar) промышленного производства;
- гектоен-агар промышленного производства;
- SS-агар (сальмонелла-шигелла агар) промышленного производства;
- среда Плоскирева промышленного производства.

4.1.2 Питательные среды для выделения энтеропатогенных типов бактерий вида *E.coli*:
- бульон Мак-Конки промышленного производства;
- бульон Кода (SDS) промышленного производства;
- среда Кесслера промышленного производства;
- ЕС-бульон промышленного производства;
- бульон Мосселя промышленного производства;
- среда Эндо промышленного производства;
- среда Левина промышленного производства;
- лактозный ТТХ агар с тергитолом промышленного производства;
- агар Мак-Конки промышленного производства;
- агар Мосселя промышленного производства;
- среда с сорбитолом промышленного производства;

4.1.3 Питательные среды для выделения бактерий рода *Proteus*:
- селективная питательная среда с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia* промышленного производства;
- селективная среда для определения бактерий родов *Proteus, Morganella Providencia* промышленного производства;
- дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus Morganella Providencia* промышленного производства;
- дифференциально-диагностический агар для подтверждения бактерий родов *Proteus, Morganella Providencia* промышленного производства;
- высокоселективная питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий (XLD-агар) промышленного производства;
- ЭНДО агар промышленного производства.

4.1.4 Питательные среды для выделения токсинообразующих анаэробов:
- сахарный кровяной агар по Цейсслеру — по ГОСТ 10444.1;
- дифференциальная улучшенная клостридиальная среда — по ГОСТ 10444.1;
- среда Вильсона-Блера, измененная для анаэробов — по ГОСТ 10444.1;
- среда Китт-Тароцци — по ГОСТ 10444.1;
- агар печеночно-желточный по ГОСТ 10444.7;
- агар триптозо-сульфит-циклосериновый по ГОСТ 10444.9;
- улучшенная клостридиальная среда промышленного производства (R. C. M.).

4.1.5 Питательные среды для идентификации микроорганизмов:
- трипказо-соевый агар (TSA) промышленного производства;
- мясо-пептонный агар (МПА) — по ГОСТ 10444.1;
- трипказо-соевый бульон (TSB) промышленного производства;
- мясо-пептонный бульон (МПБ) — по ГОСТ 10444.1;

- мясо-пептонный бульон с глюкозой — по ГОСТ 10444.1;
- ГРМ-агар промышленного производства;
- ГРМ-бульон промышленного производства;
- цитратный агар Симмонса сухой промышленного производства;
- среда (типа Клиглера) для первичной дифференциации энтеробактерий промышленного производства;
- среда Олькеницкого для первичной дифференциации энтеробактерий промышленного производства;
- трехсахарный агар (TSI-агар) — по ГОСТ 31659;
- основа агара Кристенсена с мочевиной — по ГОСТ 31659;
- питательная среда для дифференциации энтеробактерий по тесту дезаминирования фенилаланина сухая (Фенилаланин-агар) промышленного производства;
- агар SIM промышленного производства;
- триптон/триптофановая среда — по ГОСТ 31659;
- бульон Хоттингера — по ГОСТ 10444.1;
- среда Кларка — по А.1;
- среды с углеводами (среды Гисса) — по ГОСТ 10444.1;
- ПЖА (полужидкий агар) — по А.2;
- натрия хлорид, 0,85 %-ный раствор по А.3.

4.1.6 Реактивы:

- реактив Эрлиха промышленного производства;
- реактив Ковача промышленного производства;
- а-нафтол (1-нафтол) — по ГОСТ 31659;
- раствор гидроокиси калия;
- Твин 80;
- пептон сухой ферментативный — по ГОСТ 13805;
- вода дистиллированная — по ГОСТ Р 58144;
- агар микробиологический — по ГОСТ 17206;
- спирт этиловый ректификованный — по ГОСТ 5962;
- железо хлорное ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$);
- раствор панкреатина;
- промышленные наборы для окраски по Граму согласно инструкции изготовителя.

4.1.7 Приготовление питательных сред промышленного производства проводят в соответствии с информацией, представленной на этикетке. Приготовление питательных сред из собственных ингредиентов — в соответствии с приложением А.

4.2 Допускается использование других реактивов и питательных сред, в том числе хромогенных, по характеристикам и качеству не ниже вышеуказанных.

5 Средства измерений, аппаратура, посуда, материалы, реагенты и тест-штаммы

5.1 Для проведения испытаний применяют аппаратуру и материалы по ГОСТ ISO 7218 и ГОСТ ISO 22119 со следующим дополнением:

- петли стерильные пластиковые или бактериологические петли;
- пробирки стерильные, флаконы или колбы с крышками соответствующей вместимости;
- пипетки стерильные градуированные или автоматические пипетки номинальной вместимостью 25; 10; 1,0 и 0,1 $см^3$;
- наконечники одноразовые, стерильные для дозаторов;
- горелки спиртовые или газовые;
- чашки Петри стерильные стеклянные или пластиковые, диаметром от 90 до 100 мм;
- тест-штаммы контрольные: *Salmonella spp., Escherichia coli, Proteus spp., Clostridium perfringens*;
- стандарт мутности оптический бактерийных взвесей (ОСО мутности) 10 МЕ;
- стекла покровные по ГОСТ 6672;
- стекла предметные по ГОСТ 9284;
- шприцы инъекционные стерильные вместимостью 1,0 $см^3$ (инсулиновые) или 2,0 $см^3$;

- мыши белые лабораторные, клинически здоровые, массой 14—16 г;
- набор диагностический индикаторный бумажный для межродовой и видовой дифференциации энтеробактерий в соответствии с инструкцией изготовителя;
- сыворотки сальмонеллезные агглютинирующие поливалентные в соответствии с инструкцией изготовителя;
- сыворотки эшерихиозные агглютинирующие в соответствии с инструкцией изготовителя;
- сыворотки диагностические ботулинические типов A, B, C, E, F нативные лошадиные сухие для реакции биологической нейтрализации;
- тесты иммунохроматографические для фенотипического подтверждения продукции энтеротоксинов и/или шига-токсинов в соответствии с инструкцией изготовителя;
- тест-системы латексные для фенотипического подтверждения продукции шига-токсинов и/или энтеротоксинов в соответствии с инструкцией изготовителя;

наборы реагентов для выявления основных генов, отвечающих за синтез генов патогенности (шига-токсина, термолабильного и термостабильного энтеротоксина, интимина) у *Escherichia coli*, методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией изготовителя;

- наборы реагентов для выявления основных генов, отвечающих за синтез токсинов (альфа-токсин (CPA), бета-токсин (CPB), эпсилон-токсин (ETX) йота-токсин (ITX), токсин Clpb2 и NetB) у *Clostridium perfringens*, методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией изготовителя.

5.2 Допускается применение других средств измерений, аппаратуры с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не хуже указанных в настоящем стандарте.

6 Отбор и подготовка проб

6.1 Отбор проб — по ГОСТ Р 59369, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 10852, ГОСТ 13979.0, ГОСТ ISO/TS 17728.

6.2 Подготовка проб — по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ISO 6887-1 со следующими дополнениями.

Упаковку с анализируемой пробой осматривают и очищают от загрязнений, протирая тампоном, пропитанным этиловым спиртом (70 %), спирт сжигают или удаляют путем испарения. Затем упаковку вскрывают, горлышко металлических или стеклянных банок обжигают и отбирают массу (объем) пробы в количестве, необходимом для приготовления навески.

Упаковку (пакеты из фольги, полимерных материалов или из бумаги) вскрывают в месте, предварительно обработанном тампоном, пропитанным спиртом. Вскрытие упаковки проводят с соблюдением условий асептики.

При проведении испытаний грубых растительных кормов их предварительно измельчают стерильными ножницами.

Пробы с замороженным кормом/сырьем для производства кормов перед началом испытаний и приготовлением навески выдерживают при температуре (5 ± 3) °С до полного оттаивания. Навеску отбирают по 6.2 непосредственно после размораживания, но не позднее чем через 18 ч с начала размораживания.

При проведении испытаний корнеплодных растений, употребляемых на корм животным, используют навеску не менее 0,5 кг, обмывают их поверхность стерильными ватно-марлевыми тампонами, смоченными физиологическим раствором. Затем погружают ватно-марлевый тампон в емкость с 90—100 $см^3$ стерильной дистиллированной воды, тщательно встряхивают в течение 3—5 мин, отстаивают в течение 10—15 мин, используют надосадочную жидкость в необходимом объеме.

Для проб, у которых исходная суспензия слишком тягучая или густая, возможно добавление дополнительного количества разбавителя, что следует учитывать для последующих операций и/или при выражении результатов.

При проведении испытаний животного кормового жира необходимо внести в разбавитель сорбит моноолеата (Твин-80) в концентрации от 1 до 10 г/$дм^3$ в зависимости от содержания жира в продукте (например, при содержании жира 40 % добавляют 4 г/$дм^3$).

При проведении испытаний твердых и сухих кормов перед началом испытаний и приготовлением навески их измельчают в перистальтическом гомогенизаторе. Гомогенизируют не более 2,5 мин за один прием, чтобы избежать перегрева.

Порошковые полностью растворимые пробы после добавления разбавителя достаточно размешать вручную.

6.3 Подготовка десятикратных разведений

Приготовление исходной суспензии и десятикратных разведений проводят по ГОСТ Р 51426 и ГОСТ ISO 6887-1.

Интервал между приготовлением навесок продукта, их разведений и посева в питательные среды не должен превышать 30 мин.

6.4 Выбор массы навески

Масса (объем) навески, предназначенной для посева в питательные среды и/или для приготовления ее разведений, должна быть установлена в нормативной документации на конкретный вид анализируемой пробы.

7 Методы посева и культивирования

7.1 Метод посева — по ГОСТ ISO 7218 и ГОСТ 26670.

7.2 Метод культивирования — по ГОСТ ISO 7218 и ГОСТ 26670.

8 Основные методы идентификации микроорганизмов

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

8.2 Методы определения биохимической активности бактерий с использованием питательных сред и реактивов

8.2.1 Определение ферментации сахаров и сероводорода

Бактериологическую культуру засевают штрихом на скошенную часть трехсахарного агара (TSI-агар, агар Клиглера, среда Олькеницкого) и уколом в столбик. Инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Обработку результатов на агаре Клиглера проводят следующим образом. Изменение цвета скошенной поверхности среды на желтый свидетельствует о ферментации лактозы. Почернение в столбике среды свидетельствует об образовании сероводорода.

Обработку результатов на среде Олькеницкого проводят следующим образом. Изменение цвета среды в столбике на желтый свидетельствует о ферментации глюкозы. Почернение в столбике среды свидетельствует об образовании сероводорода. Изменение цвета скошенной поверхности среды на желтый свидетельствует о ферментации лактозы и/или сахарозы. При гидролизе мочевины среда приобретает ярко-малиновый цвет в столбике среды и скошенной части.

Обработку результатов на Трехсахарном железистом агаре (TSI агаре) проводят следующим образом. Изменение цвета среды в столбике на желтый свидетельствует о ферментации глюкозы. Почернение в столбике среды свидетельствует об образовании сероводорода. Изменение цвета скошенной поверхности среды на желтый свидетельствует о ферментации лактозы и/или сахарозы.

8.2.2 Гидролиз мочевины

Культуру засевают штрихом на поверхность скошенного агара с мочевиной (агар Кристенсена). Инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

При положительной реакции мочевина гидролизуется, выделяя аммиак. Это изменяет цвет фенолового красного на бледно-розовый, а затем на глубокий красно-розовый. Реакция часто становится видимой через 2—4 ч.

8.2.3 Тест образования индола

Тестируемую колонию пересевают в пробирку, содержащую 5 $см^3$ мясо-пептонного бульона с L-триптофаном, или в бульон Хоттингера или триптон/триптофановую среду.

Инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. После инкубирования добавляют 1 $см^3$ реактива Ковача или Эрлиха.

С реактивом Эрлиха результаты учитывают через 5 мин: в пограничном слое образуется ярко-красное кольцо — положительная реакция. Кольцо остается светло-желтого цвета — отрицательная реакция.

С реактивом Ковача результаты учитывают через 10 мин после взбалтывания. Реактив поднимается на поверхность среды и при наличии индола окрашивается в темно-красный цвет — положительная реакция. Кольцо остается светло-желтого цвета — отрицательная реакция.

Примечание — Допускается проводить тест образования индола с использованием комбинированных дифференциальных сред, предназначенных для изучения подвижности микроорганизмов, способности к образованию сульфида и индола (например, среды SIM).

8.2.4 Тест образования ацетоина (реакция Фогеса — Проскауэра)

Бактериологическую культуру после 18 ч инкубации засевают в пробирку, содержащую 3 $см^3$ среды Кларка или мясо-пептонного бульона с глюкозой. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

После инкубации прибавляют две капли раствора креатина, три капли спиртового раствора 1-нафтола и две капли раствора гидроксида калия, перемешивают содержимое пробирки после прибавления каждого реактива. Изменение розового цвета на светло-красный в течение 15 мин указывает на положительную реакцию. Также допускается использование готовых коммерческих тестов в виде тест-полосок или растворов.

Допускается определение ацетоина проводить без применения креатина. Для этого после инкубирования к 1 $см^3$ отобранного посевного материала прибавляют 0,6 $см^3$ раствора 1-нафтола и 0,2 $см^3$ раствора гидроокиси калия, после прибавления каждого реактива пробирку встряхивают. Реакцию считают положительной в случае появления розового окрашивания через 15 мин.

8.2.5 Определение утилизации цитрата натрия

Определение утилизации цитрата натрия проводят с использованием цитратного агара Симмонса.

Бактериологическую культуру после 18 ч инкубации засевают штрихом на скошенную поверхность среды Симмонса. Засеянные среды инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. Показателем наступившей реакции является приобретение питательной средой ярко-синего цвета. При отсутствии утилизации цитрата (отрицательный тест) цвет среды не меняется.

8.2.6 Определение фенилаланиндезаминазы

Бактериологическую культуру засевают густым штрихом на поверхность скошенной агаровой среды с фенилаланином. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. По истечении времени, необходимого для роста культуры и осуществления процесса дезаминирования фенилаланина, на поверхность среды с ростом культуры наносят 0,5 $см^3$ 10 %-ного хлорида железа, приготовленного по ГОСТ 28560, распределяя его по всей поверхности агара. Тест считают положительным, если через несколько минут после добавления раствора хлорида железа содержимое пробирки приобретает интенсивный зеленый цвет. Тест считают отрицательным, если цвет среды при добавлении раствора хлорида железа остается без изменений.

8.2.7 Определение подвижности

Бактериологическую культуру засевают уколом в столбик полужидкого агара (ПЖА). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

О наличии подвижности свидетельствуют диффузный рост вокруг линии укола и помутнение столбика ПЖА; при росте культур, не обладающих подвижностью, — только по месту укола.

Примечание — Допускается проводить определение подвижности с использованием комбинированных питательных сред, предназначенных для изучения подвижности микроорганизмов, способности к образованию сульфида и индола (например, среды SIM).

8.2.8 Определение ферментативных свойств

Для выявления ферментов, расщепляющих углеводы, используют полужидкие среды Гисса, приготовленные из коммерческих сред.

Чистую культуру засевают в полужидкие среды. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Если бактерии расщепляют углевод, то образуется кислота и при этом меняется цвет среды за счет находящегося в ней индикатора pH. При этом меняется цвет среды, и в поплавке появляется пузырек газа.

8.3 Методы определения биохимической активности бактерий с использованием коммерческих тест-систем

Для родовой и видовой идентификации допускается использование коммерческих тест-систем, предназначенных для идентификации микроорганизмов согласно инструкции производителя[1)].

Допускается использование автоматизированных или полуавтоматизированных систем идентификации[2)].

8.4 Идентификация бактерий при помощи масс-спектрометрических анализаторов и прочих приборов

В качестве альтернативного метода идентификации выделенных в ходе проведения испытаний бактерий возможно применение оборудования: масс-спектрометрических анализаторов; биохимических анализаторов. Определение видовой принадлежности проводят согласно инструкциям к приборам[3)].

8.5 Серологическое тестирование

Серологическую идентификацию проводят с культурами, предварительно пересеянными на поверхность мясо-пептонного агара или аналогичных сред (ГРМ-агара, триптиказо-соевого питательного агара).

8.5.1 Исключение само-агглютинирующих штаммов

На обезжиренное предметное стекло наносят одну каплю физиологического раствора. Растирают в этой капле часть испытуемой колонии до получения гомогенной и густой суспензии. Осторожно покачивают стекло в течение 30—60 с. Обработку результатов проводят на темном фоне при помощи лупы. Культура считается само-агглютинирующей, если бактерии выпадают в осадок в виде хлопьев или зерен на фоне полного просветления среды. Определить антигенную специфичность у таких штаммов в реакции агглютинации невозможно.

8.5.2 Определение О-антигенов

Для определения О-антигенов используют культуры, у которых не выявлено само-агглютинации. Подготовка сывороток к постановке реакции агглютинации и методика ее проведения указаны в инструкции изготовителя. Культуры испытывают с агглютинирующими моновалентными О-сыворотками. Наличие О-антигена проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости [образование хлопьев (зерен)] агглютинат. Отсутствие О-антигена проявляется образованием гомогеннной смеси после тщательного смешивания культуры с каплей сыворотки.

Допускается тестирование бактериальных культур на наличие в них специфичных генов, контролирующих синтез О-антигенов методом ПЦР и ИФА[4)].

8.5.3 Определение Н-антигенов

Для определения Н-антигенов используют ту же культуру, выросшую на питательном агаре. Гомогенная суспензия свидетельствует об отрицательном результате. Образование хлопьев (зерен) агглютината внутри капли интерпретируют как положительный результат.

[1)] Например, API 20E, API 20A, ENTEROtest 24 N, «ДС-ДИФ-ЭНТЕРО», «Рапид энтеро 50/200 М», RapID ONE, Microbact GNB 24E. Данная информация является рекомендованной и приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не исключает возможности применения других тест систем с аналогичными характеристиками.

[2)] Например,VITEK, Mini API, «Микроб-2», «Микроб-Автомат» и др. Данная информация является рекомендованной и приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не исключает возможности применения других автоматизированных или полуавтоматизированных систем с аналогичными характеристиками.

[3)] Например, MALDI-TOF MS и аналоги; биохимические анализаторы (например, Vidas, miniVidas; автоматизированные системы семейства VITEK и прочие). Данная информация является рекомендованной и приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не исключает возможности применения другого оборудования с аналогичными характеристиками.

[4)] Например, наборы реагентов, предназначенные для выявления генов, входящих в состав ДНК бактерий *Escherichia coli* серогрупп О157, О111, О26, О103 и О145 методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», VIDAS ECPT, miniVidas ECPT. Данная информация является рекомендованной и приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не исключает возможности применения других тест-систем и оборудования с аналогичными характеристиками.

9 Методы микробиологических испытаний

9.1 Методы выявления бактерий рода *Salmonella*

9.1.1 Проведение испытаний проб кормов проводят по ГОСТ 31659.

9.1.2 Проведение испытаний кормовых добавок, а также сырья для производства кормов проводят по схеме, приведенной в приложении Б.

9.1.3 Неселективное предварительное обогащение

Навеску анализируемой пробы, подготовленную по 6.2, массой 25 г, вносят в стерильный пакет для гомогенизации/колбу/флакон с забуференной пептонной водой по 4.1.2, прогретую до комнатной температуры. Инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (18 ± 2) ч. Если масса (объем) пробы иная, чем 25 г, используют необходимое количество забуференной пептонной воды, исходя из соотношения 1:10.

9.1.4 Вторичное обогащение в селективной жидкой среде

После инкубирования исходной суспензии по 9.1.3 из неселективной среды предварительного обогащения добавляют 0,1 $см^3$ посевного материала в 10 $см^3$ RVS-бульона или полужидкой среды MSRV (на выбор лаборатории) и 1,0 $см^3$ посевного материала в 10 $см^3$ одной из сред (на выбор лаборатории), предназначенной для накопления бактерий рода *Salmonella spp.* по 4.1.2.

RVS-бульон инкубируют при температуре (41,5 ± 1,0) °С в течение (24 ± 3) ч, а селенитовый бульон, магниевую среду и МКТ-бульон при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. Среду MSRV инкубируют при температуре (42 ± 1) °С в течение (15 ± 3) ч. Селенитовый бульон, магниевую среду и МКТ-бульон при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

9.1.5 Пересев на плотные селективные среды

Из каждой селективной среды после инкубирования с помощью бактериологической петли посевной материал засевают на поверхность первой плотной среды (на выбор лаборатории): XLD-агара или XLT-4 агара. Аналогичным образом проводят пересев на поверхность второй плотной среды (на выбор лаборатории), предназначенной для выявления и идентификации бактерий рода *Salmonella spp*. по 4.1.2. Высевы на плотные питательные среды необходимо делать так, чтобы получить изолированные колонии.

XLD-агар или XLT-4 агар инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч; остальные среды инкубируют в соответствии с инструкциями производителя.

На чашках Петри с MSRV-агаром через 16—18 ч инкубации, при наличии сальмонелл в анализируемой пробе, вокруг места посева отмечается диффузный рост колоний подвижных штаммов сальмонеллы в толще этой среды (от центра к периферии), окруженных светлым ореолом — зоной подвижности колоний. С края зоны подвижности колоний берут материал для пересева на дифференциально-диагностические среды. При наличии на среде MSRV роста колоний в форме пуговки проводят их биохимическую идентификацию на возможную причастность к неподвижным сальмонеллам.

9.1.6 После инкубирования чашки с посевами просматривают на наличие колоний с ростом, характерным для бактерий рода *Salmonella*.

На XLD-агаре типичные колонии бактерий рода *Salmonella* имеют черный центр и слегка прозрачную зону красноватого цвета, H_2S-отрицательные варианты бактерий рода *Salmonella* в виде розовых колоний с темным розовым центром.

На XLT-4 агаре типичные колонии бактерий рода *Salmonella* имеют черный центр и слегка прозрачную зону красноватого цвета, H_2S-отрицательные сальмонеллы образуют розово-желтые колонии без черного центра.

На Висмут-сульфит агаре типичные колонии бактерий рода *Salmonella* черные с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и прокрашиванием среды под колониями в черный цвет. Для некоторых сероваров сальмонелл характерно окрашивание колоний в светло-зеленый цвет (*S. Choleraesuis, S. Abortusovis*, *S. Gallinarum-Pullorum* и некоторые другие).

На среде Эндо типичные колонии бактерий рода *Salmonella* круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные.

На среде Плоскирева типичные колонии *Salmonella spp.* круглые, гладкие, бесцветные прозрачные, но более плотные, чем на среде Эндо.

На среде Левина типичные колонии *Salmonella spp.* прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые.

На агаре с бриллиантовым зеленым типичные колонии *Salmonella spp.* — от белых до розовых колоний с красной зоной (их цвет зависит от штамма и срока инкубирования).

На БФЛС-агаре типичные колонии *Salmonella spp*. светло-красного цвета, окруженные зоной преципитации красного цвета.

На среде SS-агар (сальмонелла-шигелла агар) типичные колонии *Salmonella spp*. прозрачные, бесцветные или бледно-желтые с черным центром или без него.

На среде гектоен-агар типичные колонии *Salmonella spp*. зеленые или зелено-синие, с черным центром или без него.

При использовании других дифференциально-диагностических сред, в том числе хромогенных, для выделения бактерий рода *Salmonella* особенности роста и характеристики колоний представлены в инструкции по их применению.

9.1.7 При отсутствии типичных и/или подозрительных колоний в посевах на дифференциально-диагностических средах работу с посевами прекращают. Конечный результат определяют как отсутствие бактерий рода *Salmonella* в анализируемой пробе.

При наличии хотя бы на одной дифференциально-диагностической среде типичных или не совсем типичных колоний для бактерий рода *Salmonella* проводят отбор колоний для дальнейшей идентификации.

9.1.8 Подтверждение принадлежности выделенных культур к роду *Salmonella*

С каждой чашки Петри плотной селективной среды отбирают не менее пяти колоний с ростом, характерным для бактерий рода *Salmonella.* Если на чашке менее пяти типичных колоний или не совсем типичных колоний, то для идентификации берут все колонии.

Отобранные колонии пересевают на поверхность предварительно подсушенных неселективных плотных питательных сред: мясо-пептонный агар, ГРМ-агар или триптиказо-соевый питательный агар. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Колонии, отобранные по 9.1.6, окрашивают по Граму и микроскопируют по 8.1.

Бактерии рода *Salmonella* — мелкие грамотрицательные палочки с закругленными концами.

С целью подтверждения принадлежности изолятов к бактериям рода *Salmonella* проводят тесты по 8.2, 8.3 или 8.4 (на выбор лаборатории).

Тесты, подтверждающие принадлежность изолятов к бактериям рода *Salmonella*, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Статус тестов	Тесты для идентификации бактерий рода *Salmonella*	Интерпритация результатов
Обязательные	Микроскопия (по 8.1)	Мелкие грамотрицательные палочки с закругленными концами
	Глюкоза* (по 8.2.1)	+
	Лактоза* (по 8.2.1)	—
	Сахароза* (по 8.2.1)	—
	Образование сероводорода* (по 8.2.1)	+
	Гидролиз мочевины (по 8.2.2)	—
	Образование индола (по 8.2.3)	—
	VP тест (по 8.2.4)	—
	Цитрат (по 8.2.5)	+
	Фенилаланиндезаминаза (по 8.2.6)	—
	Подвижность (по 8.2.7)	+
	Маннит (по 8.2.8)	+
*— интерпретацию результатов проводят при помощи трехсахарной среды; + — положительная реакция; — — отрицательная реакция.		

Типичные культуры бактерий рода *Salmonella* не ферментируют лактозу и сахарозу, ферментируют глюкозу, в большинстве случаев образуют сероводород.

Бактерии рода *Salmonella* не расщепляют мочевину, не обладают β-галактозидазой (кроме *S.* arizonae), не обладают фенилаланиндезаминазой, не образуют ацетоина (реакция Фогес-Проскауера отрицательная), не образуют индол, не ферментируют сахарозу, но ферментируют маннит, подвижны (кроме *S. Gallinarum* и *S. Pullorum*).

Для серологической идентификации используют чистые культуры бактерий, отнесенные по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам к бактериям рода *Salmonella.* Антигенную структуру сальмонелл определяют с помощью поливалентной сальмонеллезной О-сыворотки.

Дополнительно (в случае необходимости) проводят установление серовара с помощью набора промышленных сывороток сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих в РА на стекле по ГОСТ 31659.

После суммирования результатов О и Н — серотипирования определяют серовар согласно схеме Кауфмана-Уайта. Сокращенная схема классификации сальмонелл по антигенной структуре Кауфмана-Уайта приведена в приложении В.

9.1.9 Обработка результатов

Обработку (предоставление) результатов проводят по ГОСТ 31659. Результаты выявления бактерий рода *Salmonella* в определенной массе или объеме пробы записывают следующим образом: «бактерии рода *Salmonella* обнаружены или не обнаружены в *X* г (см^3) анализируемой пробы» (*X* — масса (объем) анализируемой пробы, в которой выявляли бактерии рода *Salmonella*).

9.2 Методы выявления энтеропатогенных типов бактерий вида *E. coli*

Схема проведения испытания приведена в приложении Г.

9.2.1 Проведение испытания

Из исходного разведения анализируемой пробы и/или соответствующих разведений высевают по 1,0 см^3 в 9 см^3 среды Кесслера, или одной из сред: бульон Мак-Конки, бульон Кода (SDS), бульон Мосселя и прочие по 4.1.3 (на выбор лаборатории).

Среду Кесслера инкубируют при температуре (41,5 ± 1,0) °С в течение (24 ± 3) ч, а бульон Мак-Конки, бульон Кода (SDS), бульон Мосселя при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

9.2.2 Пересев на плотные селективные среды

Из каждой пробирки с селективной жидкой средой с признаками роста после инкубирования (помутнение, газообразование, изменение цвета) с помощью бактериологической петли посевной материал засевают на поверхность селективной плотной среды (на выбор лаборатории): среду Эндо, среду Левина, лактозный ТТХ-агар с тергитолом, агар Мак-Конки, агар Мосселя или другие, в том числе хромогенные питательные среды, предназначенные для выявления и идентификации бактерий рода *Escherichia.* Высевы на плотные питательные среды необходимо делать так, чтобы получить изолированные колонии.

Среды инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (18—20) ч.

После инкубирования чашки с посевами просматривают на наличие колоний с ростом, характерным для бактерий рода *Escherichia.*

На среде ЭНДО типичные колонии *Escherichia* малиновые с металлическим блеском или без него, розовые, с красным центром колонии; лактозоотрицательные штаммы светло-розовые, иногда с бесцветным ободком, некоторые — полупрозрачные.

На Лактозном ТТХ агаре с тергитолом 7 типичные колонии *Escherichia* оранжевого цвета с желтой зоной вокруг.

На среде Левина типичные колонии *Escherichia* фиолетовые с металлическим блеском или без него.

На хромогенном агаре для определения колиформ и *E.coli* типичные колонии *Escherichia* темно-синие-фиолетовые.

На агаре Мак-Конки типичные колонии *Escherichia* — красные.

На среде с сорбитолом (*E.coli* O157:H7 агар) типичные колонии *Escherichia* малиновые, со слабо выраженным металлическим блеском или без него; сорбитол-негативные эшерихии выпуклые, гладкие, бесцветные или светло-розовые, прозрачные.

9.2.3 При отсутствии типичных и/или подозрительных колоний в посевах на дифференциально-диагностических средах работу с посевами прекращают. Конечный результат определяют как отсутствие энтеропатогенных типов бактерий вида *E. coli* в анализируемой пробе.

При наличии хотя бы на одной дифференциально-диагностической среде типичных или не совсем типичных колоний для бактерий рода *Escherichia* проводят дальнейшую идентификацию.

9.2.4 Подтверждение принадлежности выделенных культур к виду *E. coli*

При выборе колоний для подтверждения с каждой чашки каждой плотной селективной среды отбирают не менее двух колоний с ростом, характерным для бактерий рода *Escherichia.* Отобранные колонии пересевают на поверхность предварительно подсушенных неселективных плотных питательных сред: мясо-пептонный, ГРМ-агар или триптиказо-соевый питательный агар.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Отобранные колонии окрашивают по Граму по 8.1 и микроскопируют.

Определение биохимической активности штаммов выполняют по 8.2, 8.3 или 8.4 (на выбор лаборатории).

Тесты, подтверждающие принадлежность изолятов к *E. coli*, приведены в таблице 2.

Таблица 2

Статус тестов	Тесты для идентификации *E. coli*	Результаты
Обязательные	Микроскопия (по 8.1)	Мелкие грамотрицательные палочки с закругленными концами
	Глюкоза* (по 8.2.1)	+
	Лактоза* (по 8.2.1)	+
	Сахароза * (по 8.2.1)	+
	Образование сероводорода* (по 8.2.1)	—
	Образование индола (по 8.2.3)	+
	VP тест (по 8.2.4)	—
	Цитрат (по 8.2.5)	—
	Подвижность (по 8.2.7)	+/—
* — обработку результатов проводят при помощи трехсахарной среды; + — положительная реакция; — — отрицательная реакция.		

E. coli ферментирует с образованием кислоты и газа лактозу, глюкозу, сахарозу, образует индол, не продуцирует сероводород, не утилизирует цитрат, не образует ацетоина (реакция Фогеса — Проскауэра отрицательная), подвижен. Встречаются также штаммы, не ферментирующие или слабо ферментирующие лактозу.

9.2.5 Определение патогенности

Определение патогенности бактерий вида *E. coli* проводят по 9.2.5.1, 9.2.5.2 или 9.2.5.3 (на выбор лаборатории). Бактерии вида *E. coli* признают патогенными в случае положительного результата биологического исследования (гибель двух и более мышей в течение 3 сут) или выявления генов, ответственных за процесс выработки бактериальных токсинов методами ПЦР или ИХА-тестов.

9.2.5.1 Определение патогенности в биопробе на лабораторных животных

Для определения патогенных свойств бактерий используют культуры после 18—24 ч инкубации. Из культур одного вида бактерий готовят смывы 0,9 %-ным стерильным раствором хлорида натрия, устанавливают взвесь бактерий в концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток/см^3 (10 МЕ по ОСО мутности). Приготовленной взвесью культур бактерий в объеме 0,5 см^3 заражают внутрибрюшинно три белые мыши массой 14—16 г.

Культуру признают патогенной в случае гибели одной и более мышей в течение трех суток после заражения.

9.2.5.2 Определение генов патогенности (патотипа диареегенных *E. coli*) методом ПЦР

Для определения генов патогенности у выделенных культур бактерий используют мультиплексную ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в присутствии положительного контроля амплификации. Используют коммерческие наборы для прямого качественного обнаружения и дифференциации последовательности ДНК факторов вирулентности и/или для выявления и дифференциации ДНК различных групп методом ПЦР.

Для генетического типирования используют чистые культуры бактерий, выделенные с помощью бактериологических методов.

Намеченные для испытаний колонии снимают петлей и переносят в пробирку типа «Эппендорф» с 0,2 $см^3$ стерильного 0,9 %-ного раствора хлорида натрия или сверхчистой воды (воды, освобожденной от нуклеиновых кислот).

Выделение ДНК из чистых культур бактерий проводят следующим образом: стоковые образцы в пробирках типа «Эппендорф» перемешивают в закрытом виде, вносят в термостат на 15 мин при температуре 98 °С, затем центрифугируют в течение 3 мин при 12 000 $мин^{-1}$.

На чашку Петри с питательным агаром, размеченную на отдельные сектора, засевают по 25 колоний характерного для *E. coli* морфотипа (см. рисунок 1).

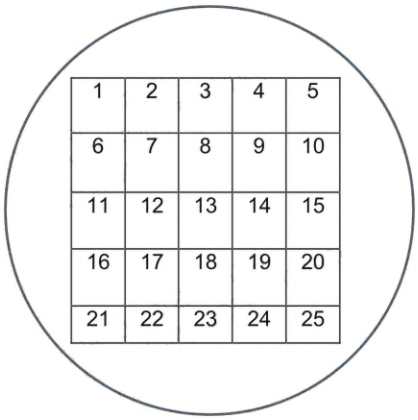

Рисунок 1 — Размещение колоний характерного для *E. coli* морфотипа

Инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. Намеченные для испытаний колонии первого ряда (колонии № 1 — № 5) петлей снимают и переносят в пробирку типа «Эппендорф». Эту операцию проводят в каждом ряду лунок.

Колонии, отобранные с первого по пятый ряд лунок включительно, тестируют с применением наборов реагентов для выявления генов, ответственных за продукцию токсинов *stx*1*, stx*2*, LT, ST* и/или факторов адгезии *eae, AidA* (ПЦР).

Для определения генов шига-токсинов 1 и 2 (*stx*1, *stx*2), интимина (*eae*), термолабильного и термостабильного энтеротоксинов (*LT, ST)* в выделенных культурах используют мультиплексную ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в присутствии положительного контроля амплификации. Используют коммерческие наборы для прямого качественного обнаружения и дифференциации последовательности ДНК факторов вирулентности *stx*1, *stx*2 и *eae E. coli* и/или для выявления и дифференциации ДНК различных групп диарогенных эшерихий (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAgEC) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом ПЦР с ГФЛ-детекцией.

Каждый изолят, в котором определены гены *stx*1 и/или *stx*2 относят к шига-токсин продуцирующим эшерихиям (STEC).

Изоляты эшерихий, у которых определены гены интимина (eae), относят к энтеропатогенным (EPEC).

Изоляты эшерихий, у которых определены гены термолабильного и термостабильного энтеротоксинов (*LT, ST*), адгезии (*AidA*) относят к энтеропатогенным (ETEC).

9.2.5.3 Выявление токсинов иммунохроматографическими экспресс-тестами

Для выявления токсинов используют иммунохроматографические экспресс-тесты (или латексные диагностикумы) коммерческого производства. Подготовку проб для испытаний и постановку иммунохроматографического теста проводят в соответствии с инструкцией по применению.

9.2.6 Серологическая идентификация

Серологическую идентификацию выделенных культур *E. coli* проводят в случае необходимости по 8.5.1 и 8.5.2. Обработку результатов серологической идентификации проводят в соответствии с приложением Г.

9.2.7 Обработка результатов

Результаты выявления энтеропатогенных типов бактерий вида *E. coli* в определенной массе или объеме анализируемой пробы записывают следующим образом: «энтеропатогенные типы бактерий вида *E. coli* обнаружены или не обнаружены в *X* г (см^3) анализируемой пробы» (*X* — масса (объем) анализируемой пробы, в которой выявляли энтеропатогенные типы бактерий вида *E. coli*).

9.3 Методы выявления бактерий вида *E. Coli*

9.3.1 Проведение испытания — *по 9.2.1*—9.2.3.

9.3.2 Подтверждение принадлежности выделенных культур к виду *E. Coli* проводят по 9.2.4.

9.3.3 Обработка результатов

Результаты выявления бактерий вида *E. coli* в определенной массе или объеме анализируемой пробы записывают следующим образом: «бактерии вида *E. coli* обнаружены или не обнаружены в *X* г (см^3) анализируемой пробы» (*X* — масса (объем) анализируемой пробы, в которой выявляли бактерий вида *E. coli*).

9.4 Методы выявления бактерий рода *Proteus*

Проведение анализа и обработку результатов проводят по ГОСТ 28560 со следующими дополнениями.

9.4.1 Выявление Н-форм бактерий рода *Proteus*

В конденсационную воду пробирок со свежескошенным питательным агаром, не касаясь поверхности среды, высевают по 0,5 см^3 исходного разведения анализируемой пробы и/или соответствующих разведений. Пробирки с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1) °С. Предварительную обработку результатов проводят через (24 ± 2) ч, окончательную — через (48 ± 2) ч инкубирования.

Н-формы бактерий рода *Proteus* из конденсационной жидкости растут вверх по поверхности среды с образованием ползучего вуалеобразного налета с голубым оттенком. Наличие характерного роста в виде тонкого вуалеобразного налета, поднимающегося вверх от конденсата на свежескошенном агаре, неспорообразующих грамотрицательных палочек в мазках указывает на присутствие бактерий рода *Proteus*.

9.4.2 Выявление бактерий рода *Proteus* методом селективного обогащения

Из исходного разведения анализируемой пробы и/или соответствующих разведений высевают по 10,0 см^3 или по 1,0 см^3 в жидкую селективную среду по 4.1.3. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

Положительными считают флаконы/пробирки, в которых наблюдается помутнение и/или изменение цвета среды. При росте бактерий, расщепляющих мочевину, наблюдается изменение цвета среды в синий. Отсутствие изменения цвета среды не является показателем отсутствия роста выявляемых бактерий.

Для подтверждения присутствия бактерий родов *Proteus* из всех флаконов/ пробирок, в которых наблюдается помутнение среды или изменение цвета, выполняют пересевы на одну из дифференциально-диагностических плотных сред по 4.1.3.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

После инкубирования чашки с посевами просматривают и отмечают присутствие «типичных» колоний бактерий *Proteus*:

- на дифференциально-диагностической питательной среде для выделения бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia* колонии *P. mirabilis* — круглые, гладкие, полупрозрачные, розовые с темным центром, диаметром от 1,0 до 2,5 мм; колонии *P. vulgaris* — круглые, гладкие, полупрозрачные, желтоватые со слабым пожелтением среды, возможно образование темного центра, диаметром от 1,0 до 2,5 мм;

- на дифференциально-диагностическом агаре для подтверждения бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia* колонии *P. mirabilis* — круглые, гладкие, коричневого цвета, возможно образование темного центра, с прокрашиванием среды под колониями в черно-коричневый цвет, диаметром от 0,9 до 1,5 мм; колонии *P. vulgaris* — круглые, гладкие, полупрозрачные, желтоватые со слабым прокрашиванием среды, возможно образование темного центра, диаметром от 0,8 до 1,5 мм;

- на XLD-агаре бактерий рода *Proteus* — в виде слизистых, желтоватого цвета или бесцветных с темным центром колоний.

Отсутствие в посевах на селективно-диагностических средах типичных или не совсем типичных колоний свидетельствуют об отсутствии бактерий родов *Proteus* в анализируемой навеске (объеме) корма.

9.4.3 Подтверждение принадлежности выделенных микроорганизмов с характерными культуральными свойствами к бактериям рода *Proteus* проводят по ГОСТ 28560.

В случае необходимости проводят определение патогенности в биопробе на лабораторных животных по 9.4.4.

9.4.4 Определение патогенности в биопробе на лабораторных животных

Для определения патогенных свойств бактерий используют бактериологические культуры после 18—24 ч инкубации. Из культур одного вида бактерий готовят смывы с использованием 0,9 %-ного стерильного раствора хлорида натрия, устанавливают взвесь бактерий в концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток/см^3 (10 МЕ по ОСО мутности). Приготовленной взвесью культур бактерий в объеме 0,5 см^3 заражают внутрибрюшинно три белые мыши массой 14—16 г.

Культуру признают патогенной в случае гибели двух и более мышей в течение четырех суток после заражения. Наблюдение за зараженными белыми мышами продолжают в течение 4 сут.

9.4.5 Обработка результатов

Результаты выявления бактерий рода *Proteus* в определенной массе или объеме анализируемой пробы записывают следующим образом: «бактерии рода *Proteus* обнаружены или не обнаружены в *X* г (см^3) анализируемой пробы» (*X* — масса (объем) анализируемой пробы, в которой выявляли бактерии рода *Proteus*).

9.5 Методы выявления токсинообразующих анаэробов

9.5.1 Навеску пробы, подготовленную по 6.2, массой 50 г растирают до гомогенной взвеси с равным двойным количеством изотонического раствора хлорида натрия и засевают по 1 см^3 в две пробирки одной из питательных сред по ГОСТ 10444.9 (Вильсона-Блера, железосульфитная среда, улучшенный клостридиальный бульон, Китта-Тароцци). С целью уничтожения вегетативных форм одну из пробирок прогревают при температуре 80 °С в течение 15 мин. Посевы помещают в термостат при температуре (37±1) °С на 48—72 ч. Возможно дополнительно использование сахарного кровяного агара Цейсслера. Чашки инкубируют в анаэробных условиях при температуре (37±1) °С 48—72 ч.

После инкубирования пробирки и чашки с посевами просматривают на наличие колоний с ростом, характерным для бактерий рода *Clostridium* (приведенные в приложении Ж).

9.5.2 Для подтверждения принадлежности характерных колоний к бактериям рода *Clostridium* отбирают не менее трех характерных колоний и пересевают их в среду для мезофильных анаэробных микроорганизмов (например, среду Китта-Тароцци). Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С 18—24 ч. Из культуральной жидкости со дна пробирок готовят препараты, окрашивают их по Граму по 8.1 и микроскопируют. Из жидких сред делают пересевы на плотные питательные среды (например, агар печеночно-желточный по ГОСТ 10444.7, агар триптозо-сульфит-циклосериновый по ГОСТ 10444.9) для получения изолированных колоний.

9.5.3 Колонии, отобранные по 9.5.2, окрашивают по Граму и микроскопируют по 8.1. Бактерии рода *Clostridium* представляет собой грамположительные палочки, которые расположены в мазках одиночно, парно, редко в виде цепочек. Характерным признаком всех клостридий является способность образовывать споры овальной или круглой формы, диаметр которых больше ширины клеток, из-за чего спорулированные палочки имеют форму веретена, лимона, барабанной палочки, теннисной ракетки (см. приложение Ж).

9.5.4 Определение биохимической активности штаммов выполняют по ГОСТ 29185.

Тесты, подтверждающие принадлежность к бактериям рода *Clostridium*, приведены в таблице 3.

Таблица 3

Статус тестов	Тесты для идентификации *Clostridium*	Результаты
Обязательные	Микроскопия (по 8.1)	Грамположительные палочки, располагающиеся в одиночку, попарно, редко в виде цепочек или скоплений параллельных клеток. При спорообразовании споры сульфитредуцирующих клостридий овальные или сферические, центральные, субтерминальные или терминальные
	Каталаза	—
	Подтверждение анаэробного роста	+
+ — положительная реакция; — — отрицательная реакция.		

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств обнаружены грамположительные, каталазоотрицательные, способные расти в анаэробных условиях микроорганизмы, то дают заключение о том, что эти микроорганизмы относятся к анаэробным бактериям рода *Clostridium*.

В случае необходимости допускается проводить видовую идентификацию по 8.3 или 8.4.

9.5.5 Определение патогенности (токсинообразования) в биопробе на лабораторных животных

Для определения патогенных свойств бактерий используют бактериологические культуры после 24—48 ч инкубации. Из агаровых культур одного вида бактерий готовят смывы 0,9 %-ным стерильным раствором хлорида натрия, устанавливают взвесь бактерий в концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток/см^3 (10 МЕ по ОСО мутности). Бульонной культурой (или приготовленной взвесью агаровых культур бактерий) в объеме 0,5 см^3 заражают внутрибрюшинно три белые мыши массой 14—16 г.

Культуру признают патогенной в случае гибели одной и более мышей в течение 12—48 ч после заражения.

9.5.6 Обработка результатов

Результаты выявления токсинообразующих анаэробов в определенной массе или объеме анализируемой пробы записывают следующим образом: «токсинообразующие анаэробы обнаружены или не обнаружены в *X* г (см^3) анализируемой пробы» (*X* — масса (объем) анализируемой пробы, в которой выявляли токсинообразующие анаэробы.

9.6 Методы выявления патогенных (токсинообразующих) бактерий рода *Clostridium*

9.6.1 Анализ и обработку результатов проводят по 9.5.1 со следующими дополнениями.

Допускается проводить видовую идентификацию по 8.3 или 8.4, в том числе с использованием тестов, приведенных в приложении И.

В случае необходимости установления вида *Cl. perfringens* и ботулинических токсинов и *Cl. botulinum* испытания проводят по 9.6.2 и 9.6.3.

9.6.2 Методы выявления токсинообразующих анаэробных микроорганизмов *Cl. perfringens*

9.6.2.1 Анализ проводят по 9.5.1.

9.6.2.2 Определение биохимической активности штаммов выполняют по ГОСТ 10444.9. Тесты, подтверждающие принадлежность к *Cl. Perfringens,* приведены в таблице 4.

Таблица 4

Статус тестов	Тесты для идентификации *Cl. perfringens*	Результаты
Обязательные	Микроскопия (по 8.1)	Грамположительные палочки, плохо или не образующие в посевах споры
	Каталаза	—
	Лактоза	+
	Пептонизация молока	+

Окончание таблицы 4

Статус тестов	Тесты для идентификации *Cl. perfringens*	Результаты
Обязательные	—	—
	Редукция нитратов	+
	Разжижение желатина	+
+ — положительная реакция; — — отрицательная реакция.		

Если при изучении ростовых, морфологических и биохимических свойств микроорганизмов, выделенных из колоний, обнаружены неподвижные грамположительные каталазоотрицательные палочки, редуцирующие нитраты, ферментирующие лактозу, разжижающие желатин и дающие характерный рост на лакмусовом молоке, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к виду *Cl. perfringens.*

Допускается проводить видовую идентификацию по 8.3 или 8.4.

9.6.2.3 Определение патогенности в биопробе на лабораторных животных проводят по 9.5.5.

9.6.2.4 Допускается проводить определение типа токсина молекулярно-генетическим методом. Для этой цели следует использовать наборы для дифференциального выявления ДНК гена *Cl. perfringens* enterotoxin альфа-токсин (CPA); гена бета-токсин (CPB); гена эпсилон-токсин (ETX); гена йота-токсин (ITX) генов токсина Clpb2 и токсина NetB. Схема токсин-типирования *Cl. perfringens* приведена в таблице 5.

Таблица 5

Токсинотипы *Clostridium perfringens*	Типируемые токсины					
	α (альфа-токсин)	β (бета-токсин)	ε (эпсилон-токсин)	ι (йота-токсин)	Clpb2	NetB
	Гены токсинов					
	CPA	*CPB*	*ETX*	*ITX*	*Clpb2*	*NetB*
Clostridium perfringens тип A	+	—	—	—	—	—
Clostridium perfringens тип B	+	+	+	—	—	—
Clostridium perfringens тип C	+	+	—	—	—	—
Clostridium perfringens тип D	+	—	+	—	—	—
Clostridium perfringens тип E	+	—	—	+	—	—
Clostridium perfringens тип F	+	—	—	—	+	—
Clostridium perfringens тип G	+	—	—	—	—	+
+ — положительная реакция; — — отрицательная реакция.						

9.6.2.5 Бактерии вида *Cl. perfringens* признают патогенными в случае положительного результата биологического исследования (гибель двух и более мышей в течение 1—2 сут) или выявления генов, ответственных за процесс выработки бактериальных токсинов методами ПЦР.

9.6.3 Методы выявления ботулинических токсинов и *Cl. botulinum*

Для выявления токсина проводят биологическую пробу на белых мышах.

Могут быть применены два способа (по 9.6.3.1 или 9.6.3.2 — на выбор лаборатории).

9.6.3.1 Метод разрушения ботулинических токсинов кипячением фильтрата

С этой целью отбирают 100 $см^3$ жидкой анализируемой пробы или экстракта, полученного с физиологическим раствором (водой) из проб плотной консистенции.

Из анализируемой пробы плотной консистенции исходную жидкость получают следующим образом. Анализируемую пробу предварительно измельчают ножом или ножницами, переносят в стерильную ступку и растирают до однородной консистенции, постоянно добавляя воду или физиологический раствор до соотношения 1:4. Полученные смеси выдерживают при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем отделяют жидкую фракцию отстаиванием или фильтрованием через ватно-марлевый фильтр, не адсорбирующий ботулинистические токсины, либо центрифугируют при 3000 мин$^{-1}$ в течение 15—20 мин. Исходную жидкость переносят в две пробирки по 2—3 см^3. Содержимое первой пробирки оставляют без обработки, второй — кипятят на водяной бане 10 мин и охлаждают до комнатной температуры.

Фильтрат из каждой пробирки вводят двум белым мышам массой 16-18 г внутривенно или внутрибрюшинно в дозе 0,5 см^3.

При наличии ботулинистического токсина животные, зараженные непрогретым фильтратом (из второй пробирки) заболевают и погибают в течение 2—5 сут, иногда — в течение первых 4—12 ч. К характерным клиническим признакам ботулизма относят следующие: шерсть у мышей взъерошена, дыхание затруднено, мышцы брюшной стенки ослаблены и западают («осиная талия»), судороги, паралич задних конечностей и смерть.

9.6.3.2 Метод определения ботулинистического токсина в реакции нейтрализации токсина (РН)

РН проводят со смесью противо-ботулинистических сывороток.

Смешивают равные объемы моновалентных сывороток типов А, В, С, Е, F и 0,6 см^3 полученной смеси добавляют в пробирку к 2,4 см^3 испытуемого фильтрата, приготовленного по 9.5.2.1. В другую (контрольную) пробирку к 2,4 см^3 испытуемого фильтрата добавляют 0,6 см^3 физиологического раствора. Содержимое пробирок перемешивают и выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре. Для биологической пробы испытуемый фильтрат (центрифугат) вначале отбирают из контрольной, а затем из опытной пробирки, по 1 см^3 вводят двум белым мышам. Наблюдение за животными ведут на протяжении 2, 4, 6, 24 ч и в течение четырех суток. У мышей, которым вводили смешанный с сывороткой фильтрат (центрифугат), признаки заболевания ботулизмом не наблюдаются. Затем ставят развернутую РН с моновалентными, типоспецифическими, антитоксическими, диагностическими сыворотками. Для этого в шесть пробирок разливают по 2,4 см^3 фильтрата. Затем в пять из них добавляют по 0,6 см^3 сыворотки типов А, В, С, Е, F, а в шестую — 0,6 см^3 физиологического раствора (контроль). Приготовленную смесь выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего вводят по 1 см^3 каждой смеси внутрибрюшинно двум мышам. Для взятия пробы из каждой пробирки используют чистый шприц. Результаты учитывают в течение четырех суток через каждые 4—6 ч, затем — через 24 ч. Мыши, которым была введена смесь токсина и гомологичной сыворотки, выживают, остальные погибают.

9.6.3.3 В случае необходимости выделение культуры токсигенных штаммов *Cl. botulinum* проводят по ГОСТ 10444.7.

9.6.4 Обработка результатов

Результаты выявления патогенных (токсинообразующих) анаэробных микроорганизмов рода *Clostridium* в определенной массе или объеме анализируемой пробы записывают следующим образом: «токсинообразующие анаэробные микроорганизмы рода *Clostridium* обнаружены или не обнаружены в *X* г (см^3) анализируемой пробы» (*X* — масса (объем) анализируемой пробы, в которой выявляли токсинообразующие анаэробные микроорганизмы рода *Clostridium*).

9.7 Методы определения КМАФАнМ *(общего количества микробных клеток, общей бактериальной обсемененности)*

Подготовку анализируемой пробы, испытания и обработку результатов проводят по ГОСТ 10444.15—94 (разделы 4—7) и ГОСТ 25311 (подраздел 4.1) со следующим дополнением.

Ряд десятикратных разведений зависит от предполагаемой контаминации продукта.

Используют следующий метод посева анализируемой пробы: проводят посев 1 см^3 анализируемой пробы (при необходимости два последовательных десятичных разведений для возможности получения от 15 до 300 колоний на чашку), добавляют 12—15 см^3 охлажденного до температуры (45 ± 2) °С агара в каждую чашку. Посевы инкубируют (72 ± 3) ч при температуре (30 ± 1) °С.

Для подсчета количества выросших колоний микроорганизмов допускается использовать также приборы: счетчики микроорганизмов для ручного контроля, автоматические анализаторы различных типов, обеспечивающие необходимую точность измерения.

Допускается определение КМАФАнМ (общего количества микробных клеток, общей бактериальной обсемененности) экспресс методами[1)].

10 Ускоренные методы выделения микроорганизмов

10.1 Обнаружение патогенных микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции

10.1.1 Общие положения

Обнаружение патогенных микроорганизмов в анализируемой пробе методом ПЦР проводят по ГОСТ ISO 20837, ГОСТ Р 52833.

Применение молекулярно-генетических методов является альтернативным с обязательным этапом предварительного обогащения анализируемой пробы в селективных и неселективных жидких питательных средах для обеспечения накопления искомых микроорганизмов.

Обнаружение генома бактерий методом ПЦР не является доказательством их жизнеспособности, так как объектом испытаний в данном случае является ДНК возбудителя. В случае обнаружения молекулярно-генетическим методом ДНК генома бактерий следует проводить микробиологическое исследование анализируемой пробы для оценки жизнеспособности микроорганизма и выявления культуры возбудителя. Экстракцию ДНК из бульонных культур проводят с использованием коммерческих наборов согласно инструкциям по применению. Процесс выделения нуклеиновых кислот — по ГОСТ ISO 20837.

Амплификацию ДНК проводят с применением коммерческих наборов согласно инструкции производителя в присутствии трех контролей реакции [отрицательный контроль выделения (ОКВ), отрицательный контроль амплификации (К–) и положительный контроль амплификации (К+)].

Обработку результатов проводят по схемам и алгоритмам производителя, указанным в инструкции по применению к используемому набору. Реакцию считают валидной только в случае получения корректных результатов всех контролей реакции.

При получении отрицательного результата дальнейшее испытание анализируемой пробы не проводят.

10.1.2 Обнаружение бактерий рода *Salmonella* молекулярно-генетическими методами (метод ПЦР)

Рекомендуемая схема ускоренного обнаружения бактерий рода *Salmonella* приведена в приложении Д.

Выделение бактерий рода *Salmonella* из анализируемой пробы проводят с первичной подготовки проб — обогащения анализируемой пробы в неселективных жидких питательных средах по 9.1.3.

Экстракцию ДНК из бульонных культур и амплификацию ДНК проводят по 10.1.1. Обработку результатов проводят по схемам и алгоритмам производителя, указанным в инструкции по применению к используемому набору. Результат считают достоверным только в случае прохождения всех контролей реакции.

Положительные результаты ПЦР в отношении бактерий рода *Salmonella*, полученные в ходе испытаний должны быть подтверждены классическими микробиологическими методами с целью определения жизнеспособности выявленного микроорганизма по 9.1.5—9.1.8.

Обработку результатов проводят по 9.1.9.

10.1.3 Обнаружение диареегенных эшерихий молекулярно-генетическими методами (метод ПЦР)

25 г анализируемой пробы стерильно вносят в пакеты для гомогенизации, размельчают их в перистальтическом гомогенизаторе или в ступке, заливают 225 см^3 забуференной пептонной воды, пробы инкубируют при температуре (37 ± 1)°С в течение 18—20 ч. После инкубации отбирают 1 см^3 в пробирку типа «Эппендорф», затем отбирают 100 мкл посевного материала и инактивируют в соответствии с инструкцией по применению коммерческих наборов. Оставшиеся 0,9 см^3 анализируемой пробы помещают в холодильник при температуре 2 °С—8 °С. Из инактивированной анализируемой пробы выделяют нуклеиновые кислоты в соответствии с инструкцией производителя.

[1)] Например, ТЕМРО АС. Данная информация является рекомендованной и приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не исключает возможности применения другого оборудования с аналогичными характеристиками.

Экстракцию ДНК из бульонных культур и амплификацию ДНК проводят по 10.1.1. Обработку результатов проводят по схемам и алгоритмам производителя, указанным в инструкции по применению к используемому набору.

Выявление ДНК диареегенных *E. coli*, а также определение патотипа *E. coli* осуществляют методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией с помощью набора реагентов в соответствии с инструкцией производителя.

Используют коммерческие наборы для выявления и дифференциации ДНК различных групп диарогенных эшерихий (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAgEC) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом ПЦР с ГФЛ-детекцией.

Положительные результаты ПЦР в отношении ДНК диареегенных *E. coli*, полученные в ходе испытаний, должны быть подтверждены классическими микробиологическими методами с целью определения жизнеспособности выявленного микроорганизма по 9.2.2—9.2.6.

Определение генов вирулентности у изолированных культур *E. coli* проводят по 9.2.5.2 или 9.2.5.3. Обработку результатов проводят по 9.2.7.

10.1.4 Обнаружение шига-токсин-продуцирующих *E. Coli* (STEC)

Обнаружение шига-токсин-продуцирующих *E. Coli* (STEC) проводят по ГОСТ ISO/TS 13136 и ГОСТ 32011.

10.2 Обнаружение патогенных микроорганизмов методом фермент-связанного флуоресцентного анализа с применением автоматического анализатора

Обнаружение патогенных микроорганизмов методом фермент-связанного флуоресцентного анализа выполняют с применением автоматического анализатора[1)].

Испытания, обработку результатов выполняют по схемам и алгоритмам производителя, указанным в инструкции по применению к используемому набору.

Проведение испытаний выполняют с использованием тест наборов, предназначенных для качественного определения бактерий методом иммуноферментного флюоресцентного анализа путем определения антигенов данных бактерий в среде обогащения после предварительного обогащения анализируемой пробы с последующей автоматизированной детекцией сигнала. При получении положительных результатов необходимо продолжить испытания согласно выделенному микроорганизму (выполнить подтверждения принадлежности выделенных культур к роду, виду, а также выполнить серотипирование и другие тесты согласно данному стандарту).

[1)] Например, Бак трак, Vidas/mini Vidas SPT, SLM, ECPT. Данная информация является рекомендованной и приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не исключает возможности применения других автоматических анализаторов с аналогичными характеристиками.

Приложение А
(рекомендуемое)

Приготовление питательных сред из собственных ингредиентов

А.1 Среда Кларка

Состав: пептон — 5,0 г, калия гидрофосфат — 5,0 г, глюкоза — 5,0 г, дистиллированная вода — 1 $дм^3$.

Приготовление: ингредиенты растворяют в дистиллированной воде; кипятят 2—3 мин; фильтруют через бумажный фильтр; устанавливают pH 6,7—7,1; разливают в пробирки по 5—7 $см^3$; стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Срок годности — 7 сут при температуре 2 °С—8 °С.

А.2 ПЖА (полужидкий агар)

Состав: пептон — 5,0 г, мясной экстракт — 3,0 г, агар микробиологический — 3,0 г, дистиллированная вода — 1 $дм^3$.

Приготовление: компоненты тщательно перемешивают и нагревают; доводят до кипения; кипятят в течение 1 мин до полного растворения; устанавливают pH 6,8—7,2; разливают в пробирки по 5—7 $см^3$; стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Срок годности — 14 сут при температуре 2 °С—8 °С.

А.3 Хлорид натрия, 0,85 %-ный раствор

Состав: хлорид натрия — 8,5 г, дистиллированная вода — 1 $дм^3$.

Приготовление: 8,5 г хлорида натрия растворяют в дистиллированной воде, устанавливают pH с расчетом, чтобы после стерилизации pH 6,8—7,2; разливают в емкости, стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

Срок годности — 30 сут при температуре 2 °С—8 °С.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Схема выявления бактерий рода *Salmonella*

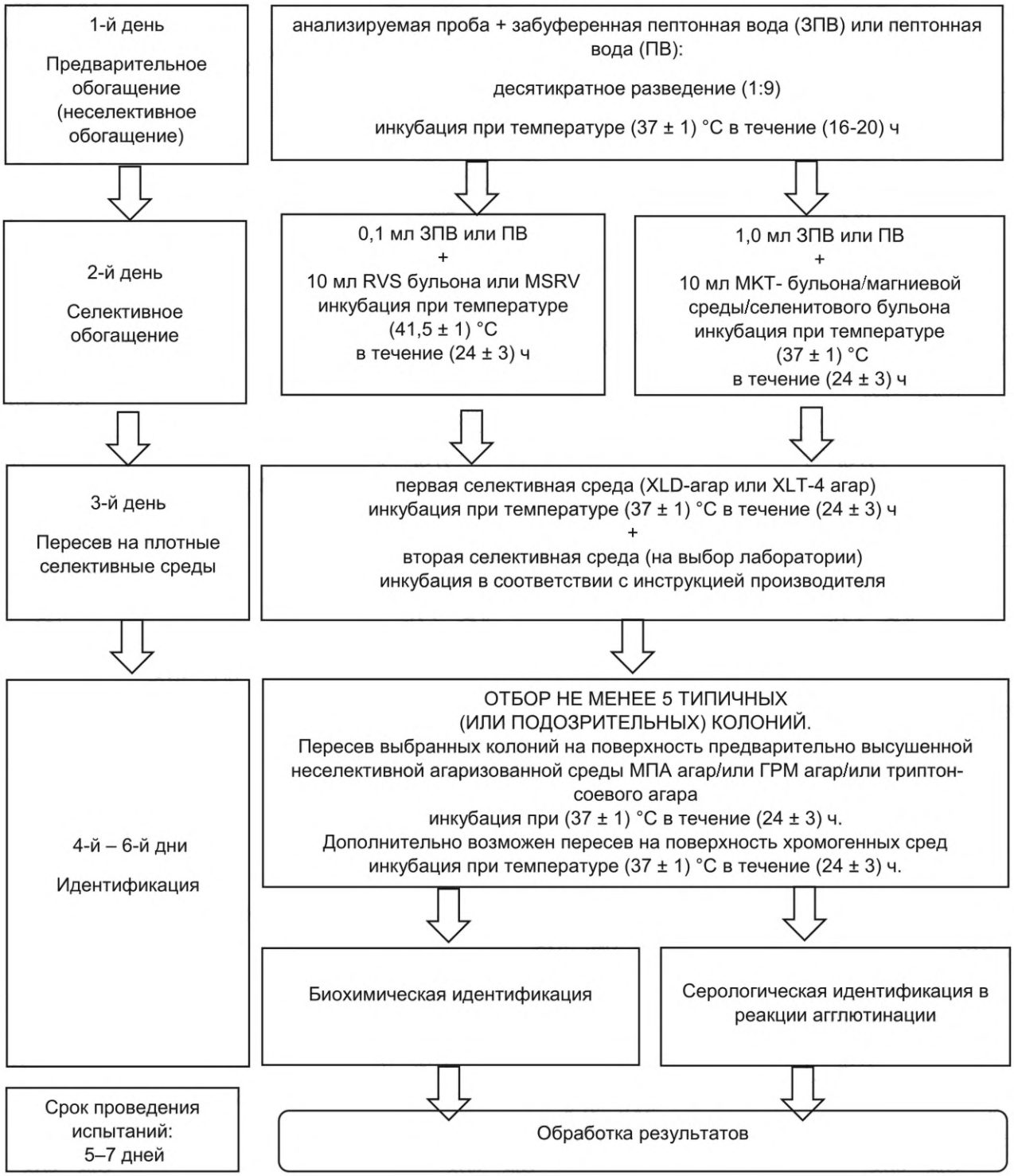

Рисунок Б.1

Приложение В
(рекомедуемое)

Схема классификации Кауфмана и Уайта (сокращенная)

Таблица В.1 — Схема классификации Кауфмана и Уайта (сокращенная)

Группа	Серовар	О антиген	Фаза 1 (жгутиковый) «Н» антиген	Фаза 2 (non-жгутиковый) «Н» антиген
A	*S*.paratyphi A	1, 2, 12	a	—
	S. paratyphi A var. durazzo	2, 12	a	—
B	*S*. paratyphi B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
	S. paratyphi B var. odense	1, 4, 12	b	1, 2
	S. java	1, 4, 5, 12	b	(1, 2)
	S. limete	1, 4, 12, 27	b	1, 5
	S. typhimurium	1, 4, 5,12	i	1, 2
	S. typhimurium-монофазный	1, 4, 5, 12	i	—
	S. typhimurium var. copenhagen	1, 4, 12	i	1, 2
	S. agama	4, 12	i	1, 6
	S. abortus-equi	4, 12	—	e, n, x
	S. abortus-ovis	4, 12	c	1, 6
	S. agona	4, 12	f, g, s	—
	S. brandenburg	4, 12	l, v	e, n, z_{15}
	S. bredeney	1, 4, 12, 27	l, v	1, 7
	S. derby	1, 4, 5,12	f, g	—
	S. heidelberg	1, 4, 5,12	r	1, 2
	S. saint-paul	1, 4, 5,12	e, h	1, 2
	S. salinatis	4, 12	d, e, h	d, e, n, z_{15}
	S. stanley	4, 5, 12	d	1, 2
C_1	*S*. paratyphi C	6, 7	c	1, 5
	S. cholerae-suis	6, 7	c	1, 5
	S. cholerae-suis var. kuunzendorf	6, 7	(c)	1, 5
	S. decatur	6, 7	c	1, 5
	S. typhi-suis	6, 7	c	1, 5
C_1	*S*. bareilly	6, 7	y	1, 5
	S. infantis	6, 7	r	1, 5
	S. menston	6, 7	g, s, t	—
	S. montevideo	6, 7	g, m, s	—
	S. oranienburg	6, 7	m, t	—
	S. thompson	6, 7	k	1, 5

Окончание таблицы В.1

Группа	Серовар	О антиген	Фаза 1 (жгутиковый) «Н» антиген	Фаза 2 (non-жгутиковый) «Н» антиген
C_2	*S.* bovis-morbificans	6, 8	r	1, 5
	S. newport	6, 8	e, h	1, 2
D	*S.* typhi	9, 12, Vi	d	—
	S. ndolo	9, 12	d	1, 5
	S. dublin	1, 9, 12	g, p	—
	S. enteritidis	1, 9, 12	g, m	—
	S. gallinarum	1, 9, 12	—	—
	S. pullorum	(1), 9, 12	—	—
	S. panama	1, 9, 12	l, v	1, 5
	S. miami	1, 9, 12	a	1, 5
	S. sendai	1, 9, 12	a	1, 5
E_1	*S.* anatum	3, 10	e, h	1, 6
	S. give	3, 10	l, v	1, 7
	S. london	3, 10	l, v	1, 6
	S. meleagridis	3, 10	e, h	l, w
E_2	*S.* cambridge	3, 15	e, h	l, w
	S. newington	3, 15	e, h	1, 6
E_3	*S.* minneapolis	(3), (15),34	e, h	1, 6
E_4	*S.* senftenberg	1, 3, 19	g, s, t	—
	S. simsbury	1, 3, 19	—	z_{27}
F	*S.* aberdeen	11	i	1, 2
G	*S.* cubana	1, 13, 23	z_{29}	—
	S. poona	13, 22	z	1, 6
H	*S.* heves	6, 14, 24	d	1, 5
	S. onderstepoort	1, 6, 14, 25	e, h	1, 5
I	*S.* brazil	16	a	1, 5
	S. hvittingfoss	16	b	e, n, x

Приложение Г
(рекомендуемое)

Схема выявления энтеропатогенных типов бактерий вида *E. coli*

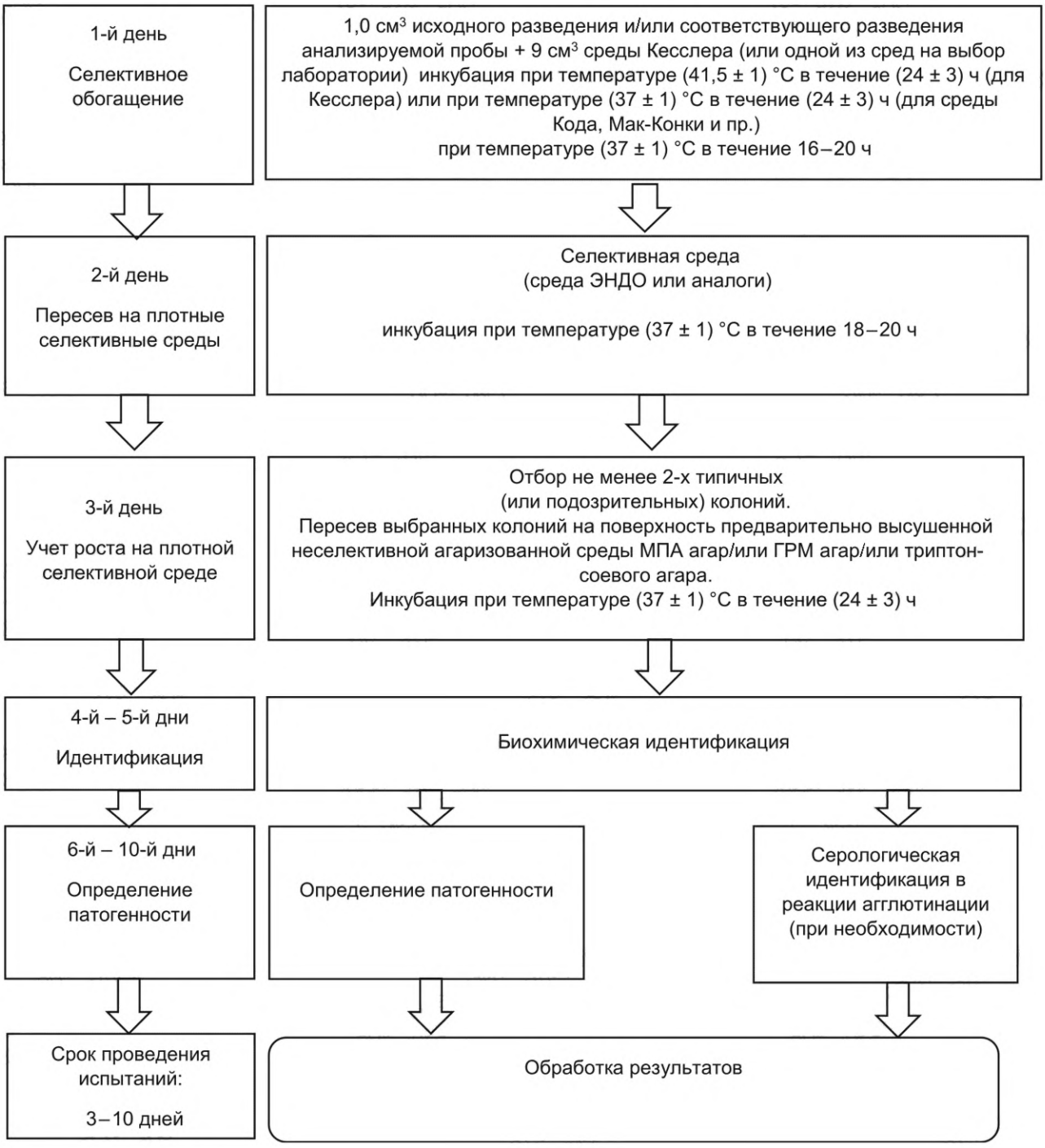

Рисунок Г.1

Приложение Д
(рекомедуемое)

Патотипы эшерихий, которые вызывают различные заболевания (кишечные, септические и другие) у животных и человека

Таблица Д.1 — Патотипы эшерихий, которые вызывают различные заболевания (кишечные, септические и другие) у животных и человека

Патотип *E. coli*	Факторы вирулентности	Распространенные серогруппы
Интестинальные *E. coli* (вызывающие диареегенные заболевания экзогенного происхождения)		
Энтеротоксигенные *E. coli* (ETEC)	Продуцируют один или несколько энтеротоксинов, вызывающих секреторную диарею: - термолабильные (LT) - термостабильные (ST)	O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O41, O63, O78, O80, O85, O101, O115, O128, O138, O139, O141, O148, O149, O153, O159, O173 и др.
Энтероинвазивные *E. coli* (EIEC)	Адгезия, колонизация и инвазия	O28, O29, O112, O121, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O164, O167, O173
Энтеропатогенные *E.coli* (EPEC)	Интимин-альфа; пили	O6, O18, O26, O33, O35, O44, O55, O86, O91, O103, O111, O112, O113, O114, O119, O117, O125, O126, O127, O128, O142, O158
Шига-токсин-продуцирующие *E.coli* (STEC)	Производят шига-подобные токсины или веротоксины. Штаммы данного патотипа могут иметь название STEC или VTEC	O26, O55, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128, O145, O157
Энтероаггреативные *E.coli* (EAEC или EAgEC)	Поражают эпителий тонкого кишечника и склонны к аутоагглютинации, характеризуются наличием фимбриальных адгезинов AAF	O3, O104, O111, O126, O139
Диффузно-адгезивные *E.coli* (DAEC)	Обладают фимбриальными и афимбриальными адгезинами	O86, O127, O142, O158
Группа экстраинтестинальных эшерихий ExPEC не характеризуется постоянной группой факторов вирулентности		
Уропатогенные *E. coli* (UPEC)	Фимбриальные P- и S- адгезины специфические афимбриальные адгезины. Продуцируют цитотоксический некротизирующий фактор и обладают гемолизом за счет наличия Hly-плазмиды	O1, O2, O4, O6, O7, O8, 09, O11, O12, O14, O15, O16, O17, O18, O21, O22, O25, O50, O75, O77, O78, O81, O83, O85, O86
Neonatal Meningitis *E. coli* (NMEC)	Обладает высокой степенью гомологичности с возбудителем эшерихиоза птиц (Avia pathogenic *E. Coli*), так как оба используют схожие факторы вирулентности и патогенез, а также относятся к одной серогруппе (например O18). К данному патотипу относятся серогруппы O1, O8, O18	O1, O8, O18
Септические *E. coli* (SePEC)	Обладают фимбриальными и афимбриальными адгезинами, устойчивостью к фагоцитозу. Кроме того, данный патотип может обладать капсульным антигеном K2 и фимбриями P и F17	O153
Авиапатогенные *E. coli* (APEC)	К факторам вирулентности, типичным для APEC, относятся гемолизин, колицин, белок повышенной выживаемости в сыворотке, фимбрии типа I, термочувствительный гемагглютинин и сидерофоры	O1, O2, O5, O8, O18, O78

Приложение Е
(рекомедуемое)

Блок-схема ускоренного обнаружения бактерий рода *Salmonella* в кормах с использованием метода ПЦР

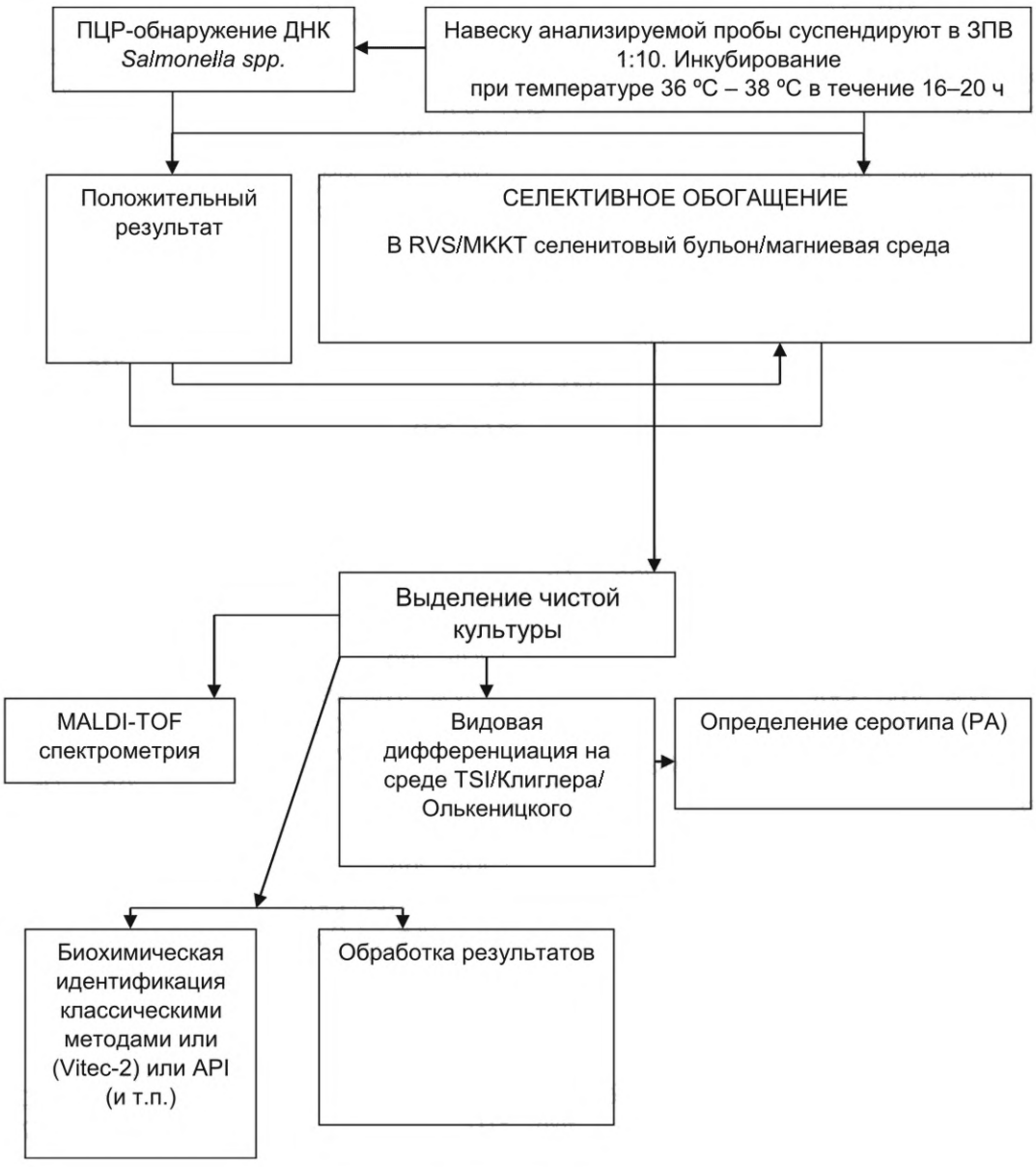

Рисунок Е.1

Приложение Ж
(рекомендуемое)

Культурально-морфологические свойства клостридий

Таблица Ж.1 — Культурально-морфологические свойства клостридий

Наименование возбудителя	Морфология клеток	Форма спор и их расположение	Характеристика роста на среде Китт—Тароцци	Характеристика колоний при росте на глюкозо—кровяном агаре
C. bifermentans	Грамположительные прямые палочки, в мазках расположены одиночно, попарно или в виде коротких цепочек	Споры овальной формы, с центральным или субтерминальным расположением. Образование споры не вызывает утолщение клетки	Газ не образуется, через 24 ч культивирования появляется осадок. Рост сопровождается гнилостным запахом	Мелкие круглые колонии с ровными краями, плоские или слегка выпуклые, полупрозрачные или непрозрачные, серые, блестящие и гладкие; гемолиз отсутствует, иногда слабый
C. colinum	В свежих культурах грамположительные прямые палочки, в старых культурах грамотрицательные. Расположение в мазках: отдельными клетками или парное	Споры овальной формы, с субтерминальным расположением	Рост через 12—16 ч после посева. Вначале активное газообразование, затем рост замедляется, газообразование прекращается, выпадает белый осадок с просветлением среды	Колонии до 0,5 мм, округлые или слегка неровные, выпуклые, прозрачные, серые, реже белые или бесцветные, блестящие, гладкие. Окружены зоной альфа-гемолиза
C. sporogenes	Палочки с закругленными концами, расположены одиночно, иногда цепочками	Споры овальные, расположены субтерминально. Споры образуются очень быстро, в мазках из культур почти у всех палочек обнаруживают споры. Образование спор приводит к увеличению толщины клетки	Рост обильный, кусочки печени обволакивают слизистым осадком, верх среды прозрачный, газообразование слабое, неприятный гнилостный запах	Круглые или неровные с ризоидными краями и приподнятым центром в виде переплетенных нитей (голова медузы). Полупрозрачные с матовой поверхностью и желтовато-серым оттенком. Гемолиз интенсивный
C. sordellii	Крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены чаще цепочками по 2—4 клетки	Споры овальной формы, расположены субтерминально или центрально	Помутнение более интенсивное внизу, умеренное газообразование; при старении культур — слизистый осадок	Неправильной формы, корневидные, складчатые, с сероватой шероховатой поверхностью и изрезанными краями, гемолиз сильный
C. septicum	Изолированные палочки с закругленными концами, в мазках-отпечатках с серозных оболочек имеют форму нитей	Споры овальной формы, расположены субтерминально или центрально	Интенсивное помутнение, обильное газообразование	Нежный бесцветный, вуалеобразный налет с микроскопически изрезанными краями и часто с нежными отростками, b-гемолиз

Окончание таблицы Ж.1

Наименование возбудителя	Морфология клеток	Форма спор и их расположение	Характеристика роста на среде Китт—Тароцци	Характеристика колоний при росте на глюкозо—кровяном агаре
C. difficile	Грамположительные прямые палочки	Споры овальной формы с терминальным и субтерминальным расположением	Через 24—48 ч вызывает диффузное помутнение среды с образованием зернистого осадка. Сопровождается запахом «скотного двора» или лошадиного помета	Круглые, иногда ризоидные, плоские или слабо выпуклые, непрозрачные, сероватые с матовой поверхностью. У большинства штаммов гемолиз отсутствует. После 24—48 ч роста на кровяном агаре заметна бледная желто-зеленая флюоресценция в ультрафиолетовом свете
C. fallax	Грамположительные прямые или слегка изогнутые палочки. В мазках расположены одиночно или парно	Споры овальной формы с центральным или субтерминальным расположением	Интенсивное помутнение, обильное газообразование	Мелкие, слегка выпуклые, полупрозрачные, серые, блестящие и гладкие колонии, круглые или слегка неправильной формы, с размытыми краями, структура зернистая. b-гемолиз
C. oedematiens	Крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены одиночно, редко парно или цепочками по 3—4 клетки	Споры овальные, расположены субтерминально или центрально	Рост более интенсивный внизу, через 18—24 ч МППБ просветляется, выпадает хлопьевидный осадок, газообразование слабое	Шероховатые, корневидные, складчатые с изрезанными краями и выпуклым темным центром, гемолиз сильный, прозрачный, но может отсутствовать
C. perfringens	Толстые палочки со слегка закругленными концами, расположены одиночно	Споры овальные, расположены субтерминально или центрально. В мазках из свежего трупа и молодых культур спор не обнаруживают	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование	Округлые, гладкие, выпуклые серовато-зеленые колонии. Гемолиз сильный, грязно-коричневого цвета, имеет две зоны. Среда становится буроватого цвета
C. haemolyticum	В свежих культурах Гр+ прямые палочки, в старых культурах грамотрицательные. В мазках имеют одинарное или парное расположение	Споры овальной формы с субтерминальным расположением. Образование спор приводит к увеличению толщины клетки	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование	Округлые, гладкие, блестящие, выпуклые серовато-зеленые колонии с зернистой структурой, слегка разрушенный волнистый край. Гемолиз имеет две зоны. Среда становится буро-коричневого цвета
C. botulinum	Толстые палочки с закругленными концами, расположены попарно, иногда в виде цепочек	Споры овальные или круглые, расположены субтерминально, редко центрально	Рост медленный, до 48 ч, газообразование слабое. Появляется интенсивная муть, которая оседает на дно, бульон просветляется	Круглые, шероховатые или корневидные, нежно-серые колонии, гемолиз прозрачный

Приложение И
(рекомендуемое)

Биохимические свойства этиологически значимых для животных видов клостридий

Таблица И.1 — Биохимические свойства этиологически значимых для животных видов клостридий

Наименование тестов для идентификации	*Cl. fallax*	*Cl. colinum*	*Cl. perfringens*	*Cl. septicum*	*Cl. sordellii*	*Cl. haemolyticum*	*Cl. sporogenes*	*Cl. histolyticum*	*Cl. novyi mun A*	*Cl. novyi mun B*	*Cl. novyi mun C*	*Cl. botulinum*	*Cl. tetani*	*Cl. difficile*	*Cl. chauvoei*
Грамположительные	+	+	+	v	+	v	+	+	+	+	+	+	v	+	+
Расположение спор	Ц.С.	С.	Ц.С.	С.	Ц.С.	С.	С.	Ц.С.	Ц.С.	Ц.С.	Ц.С.	С.	Т.С.	Т.С.	Ц.С.
Образование спор	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Каталаза	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Анаэроб	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+
Форма спор	О.	О.	О.	О.	О.	О.	О.	О.	О.	О.	О.	О.	К.О.	О.	О.
Подвижность	v	+	—	v	+	+	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Гидролиз желатина	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+
Лактоза	v	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Уреаза	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Бета гемолиз	+	—*	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
Индол	—	—	—	—	+	+	—	—	—	v	+	v	v	—	—
Ферментация глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	—	v	+	+	+	—	+	+
Лецитиназа	—	—	+	—	v	+	v	—	v	+	—	v	—	—	—
Сукроза	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	v	—	—	+
Гидролиз эскулина	+	+	v	v	v	—	+	—	—	—	—	v	—	v	+
D-манноза	v	+	+	v	v	v	—	—	—	v	+	v	—	v	+
Мальтоза	+	+	+	+	v	—	v	—	v	v	—	v	—	—	+
Целлобиоза	v	—	v	v	—	v	—	—	—	—	—	—	—	v	—
Салицин	—	v	—	v	—	—	—	—	v	—	—	—	—	v	—
D-ксилоза	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	v	—
Трегалоза	—	+	v	v	—	v	—	—	—	—	—	v	—	v	—
Раффиноза	—	+	v	—	—	v	—	—	—	v	—	—	—	—	—
ONPG	n	n	+	+	v	n	—	v	n	n	n	—	—	—	n

Окончание таблицы И.1

Наименование тестов для идентификации	*Cl. fallax*	*Cl. colinum*	*Cl. perfringens*	*Cl. septicum*	*Cl. sordellii*	*Cl. haemolyticum*	*Cl. sporogenes*	*Cl. histolyticum*	*Cl. novyi тип A*	*Cl. novyi тип B*	*Cl. novyi тип C*	*Cl. botulinum*	*Cl. tetani*	*Cl. difficile*	*Cl. chauvoei*
D-маннитол	—	v	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	v	v	—
Дезоксирибону-клеаза	+	n	+	v	—	—	v	—	—	—	—	v	v	—	+
Гидролиз казеина	—	—	v	v	v	—	+	v	v	v	v	v	v	—	—
Липаза	—	—	—	—	—	—	v	—	+	—	—	+	v	—	—
L-рамноза	—	—	—	—	—	v	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-арабиноза	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Мелибиоза	—	—	v	—	—	v	—	—	—	—	—	v	—	—	—
Гидролиз крахмала	—	—	v	—	—	—	—	—	—	—	—	v	—	—	—
D-Сорбитол	—	—	v	—	—	—	—	—	—	—	—	v	—	v	—
Глицерол	—	n	—	—	—	v	—	—	v	—	—	—	—	—	—
Мио-инозитол	—	—	v	—	—	v	—	—	v	v	+	—	—	—	—
Дульцитол	—	n	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	v

* — альфа гемолиз;

\+ — положительное значение теста;

— — отрицательное значение теста;

v — вариабельный результат значения теста;

n — не определялись;

К. — круглая форма спор;

О. — овальная форма спор;

Ц. — центральное расположение спор;

С. — субтерминальное расположение спор;

Т. — терминальное расположение спор.

УДК 579.672: 579.64:006.354 ОКС 65.120

Ключевые слова: корма, кормовые добавки для животных, сырье для производства кормов, бактерии рода *Salmonella*, *Proteus*, энтеропатогенные типы бактерий вида *Escherichia coli*, токсинообразующие анаэробы, проба, методы выявления, полимеразная цепная реакция

Редактор *Н.А. Аргунова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 30.12.2025. Подписано в печать 10.02.2026. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,65. Уч.-изд. л. 3,95.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru