ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ГОСТ Р 51921-2011

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Метады выяўлення і вызначэння бактэрый Listeria monocytogenes

(ГОСТ Р 51921-2002, IDT)

Издание официальное

БЗ 2-2011



Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 664:579.672(083.74)(476)	МКС **07.100.30**; 67.080.20; 67.100; 67.120	КП 06	IDT

Ключевые слова: пищевые продукты, мясо, субпродукты, мясные продукты, рыба, нерыбные объекты промысла, рыбные продукты, молоко, молочные продукты, маргарин, майонез, свежие и свежезамороженные овощи, картофель, салаты из овощей, питательные среды, отбор и подготовка проб, селективное обогащение, выделение культур микроорганизмов, идентификация листерий, оценка результатов, Listeria monocytogenes

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 28 марта 2011 г. № 14

3 Настоящий стандарт идентичен национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes», который соответствует международному стандарту ISO 11290.2:1998 «Микробиология продуктов питания и животных кормов. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета микроорганизмов Listeria monocytogenes. Часть 2. Метод подсчета» в части пп. 9.1, 9.2, 9.3, 9.4.1 – 9.4.4, 9.5.1 – 9.5.3, В.4, В.5.

Национальный стандарт Российской Федерации разработан Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В. М. Горбатова» (РАСХН) (головная организация); Государственным учреждением «Научно-исследовательский институт питания» (РАМН); Государственным учреждением «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф.Гамалеи» (РАМН); Государственным унитарным предприятием «Государственный научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт по развитию и эксплуатации флота»; Государственным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» (РАСХН).

Официальные экземпляры национального стандарта Российской Федерации, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В стандарт внесены редакционные изменения и дополнения, выделенные в тексте курсивом.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылочные документы актуализированы.

Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному национальному стандарту Российской Федерации приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2011

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Определения и сокращения 2
4 Аппаратура, материалы и реактивы 2
5 Отбор и подготовка проб 3
6 Подготовка к исследованию 3
7 Проведение исследования 4
8 Обработка результатов 10
9 Требования безопасности 10
Приложение А (справочное) Состав питательных сред 11
Приложение Б (справочное) Библиография 17
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному национальному стандарту Российской Федерации 19

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Метады выяўлення і вызначэння бактэрый Listeria monocytogenes

Food products
Methods for detection and determination of Listeria monocytogenes bacter

Дата введения 2011-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты (в том числе на продукты детского, лечебного и специализированного питания): мясо, включая мясо птицы, субпродукты и мясные продукты; рыбу, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них; молоко и молочные продукты; маргарин, майонез, свежие и свежезамороженные овощи, картофель, салаты из овощей, и устанавливает метод выявления и определения в них бактерий вида Listeria monocytogenes.

Метод основан на высеве определенного количества пищевого продукта в жидкую селективную питательную среду (с предварительным обогащением), последующем пересеве на агаризованные селективно-диагностические среды и культивировании посевов при оптимальных условиях. Принадлежность выявленных колоний к Listeria monocytogenes определяют по биологическим свойствам.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие документы:

ГОСТ 976-81 Маргарин, жиры для кулинарии, кондитерской и хлебопекарной промышленности. Правила приемки и методы испытаний

ГОСТ 3145-84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 4288-76 Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса. Правила приемки и методы испытаний

ГОСТ 6672-75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 7702.2.0-95 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим испытаниям

ГОСТ 9225-84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 9284-75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 9958-81 Изделия колбасные и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа

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

ГОСТ 10444.8-88 Продукты пищевые. Метод определения Bacillus cereus

ГОСТ 13928-84 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 21237-75 Мясо. Методы бактериологического анализа

ГОСТ 25706-83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 26668-85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26670-91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 26809-86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

Издание официальное

ГОСТ 30004.2-93 Майонезы. Правила приемки и методы испытаний

ГОСТ 30425-97 Консервы. Метод определения промышленной стерильности

ГОСТ 31339-2006 [1] Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 51447-99 (ИСО 3100-1-91) Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб

ГОСТ Р 51448-99 (ИСО 3100-2-88) [2] Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований

СП 1.2.731-99 [3] Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности и гельминтами

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие технических нормативных правовых актов в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА) по каталогу, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененными (измененными) ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Определения и сокращения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями и сокращениями:

бактерии рода Listeria (далее – листерии): Грамположительные неспорообразующие короткие палочки с закругленными концами, иногда почти кокки, одиночные или в коротких цепочках (0,4-0,5 × 0,5-2,0 мкм), реже образуют длинные нити.

Listeria monocytogenes: Вид бактерий рода Listeria, патогенный для человека и животных, принадлежность к которому устанавливают путем дифференциации от непатогенных видов Listeria по культуральным, биохимическим и биологическим свойствам.

МПА – мясопептонный агар;

МПБ – мясопептонный бульон;

ПБЛ – питательный бульон для выделения и культивирования листерии;

ПАЛ – питательный агар для выделения листерии.

4 Аппаратура, материалы и реактивы

4.1 Аппаратура, материалы и реактивы – по ГОСТ 10444.1 со следующими дополнениями:

– анализатор иммунно-ферментный типа mini VIDAS с использованием стрипового набора VIDAS LMO;

– дозаторы пипеточные по [1];

– лупа по ГОСТ 25706;

– микроскоп биологический с иммерсионной системой и увеличением 900х;

– pH-метр модели 2696 по [2];

– петля бактериологическая из платины/иридия, никеля, хрома или пластиковая диаметром 3 мм;

– пипетки градуированные по ГОСТ 29227, второго класса точности;

– пипетки пастеровские;

– слайды или планшеты для иммунологических реакций по [3];

– стекла предметные по ГОСТ 9284;

– стекла покровные по ГОСТ 6672;

– термометр цифровой по [4];

– часы механические сигнальные по ГОСТ 3145;

– бактериофаг листерийный L-3A по [5];

– гидролизат казеина панкреатический;

– диагностикум антительный латексный для выявления листерии «Листерия-AG-тест» по [6];

– манноза;

– система API Listeria для определения ферментативных свойств по [7];

---

[1] Действует взамен ГОСТ 7631-85.

[2] Действует до введения СТБ, разработанного на основе ГОСТ Р.

[3] На территории Республики Беларусь действует СП 17-129 РБ 2000.

– стандарт мутности Макфарланда, соответствующий 1 ЕД;
– сыворотка поливалентная листериозная агглютинирующая по [8];
– тест-штамм Listeria monocytogenes 766;
– тест-штамм Rhodococcus equi гемолитический;
– тест-штамм Staphylococcus aureus гемолитический.

5 Отбор и подготовка проб

5.1 Отбор и подготовку проб пищевых продуктов проводят в соответствии с ГОСТ 26668, ГОСТ 26669, а также в соответствии с *ТНПА* и техническими документами на конкретные виды продуктов.

Масса или объем навески должны составлять (25 ± 0,1) г ($см^3$), (50 – 100 г или 50 – 100 $см^3$ – для продуктов детского, лечебного и специализированного питания).

5.2 Отбор и подготовку проб мяса, включая мясо птицы, субпродуктов, мясных полуфабрикатов, колбасных изделий и других мясных продуктов, в том числе продуктов детского, лечебного и специализированного питания, проводят по 5.1 и ГОСТ 4288 (1.3, 2.1, 2.11.3), ГОСТ 7702.2.0, ГОСТ 9792, ГОСТ 9958 (3.33), ГОСТ 21237 (1.1 – 1.3, 3.3), ГОСТ Р 51447, ГОСТ Р 51448.

5.3 Отбор и подготовку проб молока и молочных продуктов, в том числе продуктов детского, лечебного и специализированного питания, проводят по 5.1 и ГОСТ 9225 (1.1 – 1.7), ГОСТ 13928, ГОСТ 26809, [9].

5.4 Отбор и подготовку проб маргарина и майонеза проводят по 5.1 и ГОСТ 976 (2.1), ГОСТ 30004.2 (1.2, 2.1), [10].

5.5 Отбор и подготовку проб рыбы, нерыбных объектов промысла и продуктов, вырабатываемых из них, в том числе продуктов детского, лечебного и специализированного питания, проводят по 5.1 и *ГОСТ 31339 (4.2, 5.1 – 5.3)*, [11] и [12].

5.6 Отбор и подготовку проб плодоовощной продукции, в том числе продуктов детского, лечебного и специализированного питания, проводят по 5.1 и [13].

6 Подготовка к исследованию

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Пептонно-солевой раствор для приготовления разведений – по ГОСТ 26669 (1.2).
6.1.2 Растворы и реактивы для окраски по Граму – по ГОСТ 10444.1 (4.25).
6.1.3 Физиологический раствор – по ГОСТ 10444.1 (4.29).
6.1.4 Раствор с объемной долей перекиси водорода 3 % – по ГОСТ 10444.1 (4.33).

6.1.5 Приготовление растворов для постановки реакции нитратредукции

Раствор А готовят по ГОСТ 10444.8 (3.1.7).
Раствор Б готовят по ГОСТ 10444.8 (3.1.6).
Непосредственно перед постановкой реакции растворы А и Б смешивают.

6.2 Приготовление питательных сред

6.2.1 Среды для поддержания выделенных культур и культивирования бактерий рода Listeria

6.2.1.1 МПБ с 1 % глюкозы – по ГОСТ 10444.1 (5.13).
6.2.1.2 МПА с 1 % глюкозы – по ГОСТ 10444.1 (5.13).
6.2.1.3 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) – по [14].
6.2.1.4 Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) – по [14].
6.2.1.5 Трипказо-соевый бульон (TSB) – по [15].
6.2.1.6 Трипказо-соевый агар (TSA) – по [15].
6.2.1.7 Состав питательных сред и способы приготовления приведены в А.1.1 – А.1.4 (приложение А).

6.2.2 Среды селективные для предварительного обогащения

6.2.2.1 ПБЛ I – по [16].
6.2.2.2 Бульон Фразера полуконцентрированный (Half Fraser broth) – по [14], [15].
6.2.2.3 Состав питательных сред и способы приготовления приведены в А.2.1, А.2.2 (приложение А).

6.2.3 Среды селективные для обогащения

6.2.3.1 ПБЛ II – по [16].

6.2.3.2 Бульон Фразера (Fraser broth) – по [14], [15].

6.2.3.3 Состав питательных сред и способы приготовления приведены в А.3.1, А.3.2 (приложение А).

6.2.4 Среды селективно-диагностические

6.2.4.1 Среда ПАЛ – по [18].

6.2.4.2 Оксфордский агар (Oxford agar) – по [14], [15].

6.2.4.3 ПАЛКАМ агар (PALCAM agar) – по [14], [15], [17].

6.2.4.4 Состав питательных сред и способы приготовления приведены в А.4.1 – А.4.3 (приложение А).

6.2.5 Среды для изучения биологических свойств при идентификации листерий

6.2.5.1 Питательная среда ГРМ № 1 – по [19].

6.2.5.2 Кровяной агар

К 100 $см^3$ растопленного и охлажденного до 45 °С – 50 °С МПА с 1 % глюкозы добавляют 5 – 10 $см^3$ стерильно взятой дефибринированной крови животных. Смесь осторожно перемешивают и разливают в чашки Петри (не более 10 $см^3$ на чашку). Слой агара должен быть равномерно окрашен в красный цвет. Среду подсушивают при (37 ± 1) °С в соответствии с ГОСТ 26670 (4.2.1) и хранят не более 2 сут при температуре (4 ± 1) °С. Среда должна иметь pH 7,2 – 7,4.

Для посева используют теплые чашки.

6.2.5.3 Лецитин-агар с активированным углем и без угля

К питательной среде ГРМ № 1 перед стерилизацией добавляют 0,5 % активированного угля, растертого до порошкообразного состояния.

Желток куриного яйца разводят с соблюдением правил асептики в 150 $см^3$ физиологического раствора и добавляют в количестве 5 % по объему к стерилизованной и охлажденной до 40 °С – 45 °С питательной среде. Разливают в чашки Петри не более 20 $см^3$ на чашку и подсушивают при (37 ± 1) °С.

Аналогично готовят агар с добавлением желтка, без добавления активированного угля.

6.2.5.4 Нитратную среду готовят по ГОСТ 10444.8 (3.2.9).

6.2.5.5 Полужидкую питательную среду (Listeria motility medium) для определения подвижности листерий готовят в соответствии с А.5.1 (приложение А).

6.2.5.6 Среды Гисса готовят по ГОСТ 10444.1 (5.29), используя в качестве углевода рамнозу, ксилозу, маннозу и маннит.

6.2.5.7 МПБ с 0,5 % глюкозы готовят по ГОСТ 10444.1 (5.13), но при приготовлении добавляют 5 г глюкозы.

6.2.5.8 МПА готовят по ГОСТ 10444.1 (5.12).

6.3 Среды по 6.2.2, 6.2.3, 6.2.4 готовят накануне или непосредственно перед использованием в соответствии с указанием на этикетке.

Готовые среды хранят в темноте, так как отдельные компоненты, входящие в их состав, например акрифлавин, могут окисляться на свету, образуя продукты, подавляющие рост листерий.

7 Проведение исследования

7.1 Предварительное селективное обогащение

Навеску пищевого продукта массой (25 ± 0,1) г или объемом (25 ± 0,1) $см^3$ по 5.1 вносят в 225 $см^3$ одной из жидких сред для предварительного обогащения, приготовленных по 6.2.2. Содержимое встряхивают 25-кратными круговыми движениями радиусом 30 см.

Массу навески продуктов детского, лечебного или специализированного питания отбирают по 5.1. Соотношение между количеством высеваемого продукта и питательной средой должно составлять 1 : 9.

Посевы культивируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

При росте листерий на полуконцентрированном бульоне Фразера, содержащем эскулин, отмечают почернение среды за счет гидролиза гликозида эскулина до глюкозы и эскулетина. Эскулетин реагирует с ионами железа, образуя комплекс черного или оливкового цвета.

На ПБЛ I, не содержащем эскулин, почернение не происходит.

7.2 Селективное обогащение

После инкубирования продукта по 7.1 содержимое среды, независимо от наличия в ней изменений, в количестве 0,1 $см^3$ пересевают в 10 $см^3$ одной из жидких сред обогащения. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

На бульоне Фразера, содержащем эскулин, отмечают почернение среды как признак возможного присутствия листерий.

На среде ПБЛ II почернение не происходит.

7.3 Выявление характерных колоний на агаризованных селективно-диагностических средах

7.3.1 Из пробирок после инкубирования по 7.2, независимо от наличия или отсутствия признаков роста, в том числе почернения, делают посев бактериологической петлей из культуральной жидкости на поверхность одной из агаризованных селективно-диагностических сред, указанных в 6.2.4. Допускается проводить пересев параллельно на поверхность двух плотных селективно-диагностических сред.

Посевной материал растирают по поверхности шпателем или распределяют петлей в виде штриха. Подготовку чашек Петри со средой к посеву и посев проводят по ГОСТ 26670. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 – 48 ч.

7.3.2 После инкубирования по 7.3.1 чашки с посевами просматривают и отмечают рост характерных колоний.

При отсутствии роста характерных колоний листерий на селективно-диагностических средах, указанных в 6.2.4, исследование прекращают и делают заключение об отсутствии Listeria monocytogenes в исследуемой пробе продукта.

На среде ПАЛ рост листерий сопровождается потреблением эскулина и почернением колоний и питательной среды. Через 24 ч инкубирования они образуют мелкие серовато-желтые колонии с черным ореолом диаметром от 1,0 до 2,0 мм. Посторонняя кокковая микрофлора образует выпуклые колонии лимонно-желтого цвета диаметром от 1,0 до 4,0 мм, окруженные слабым (или без него) покраснением питательной среды.

На ПАЛКАМ агаре (PALCAM agar) через 24 ч инкубирования листерии формируют мелкие серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом диаметром от 1,0 до 1,5 мм, иногда с черным центром. Через 48 ч колонии диаметром 1,5 – 2,0 мм приобретают зеленую окраску с углубленными центрами, окруженными черным ореолом. Посторонняя кокковая микрофлора образует выпуклые желтые колонии диаметром от 1,0 до 4,0 мм.

На Оксфордском агаре колонии листерий через 24 ч инкубирования – мелкие, диаметром 1 мм, сероватые, окруженные черным ореолом. Через 48 ч – более темные, около 2 мм в диаметре, с черным ореолом и углубленным центром.

При появлении сплошного роста листерий проводят пересев бактериологической петлей из зон наибольшего почернения среды штрихами на поверхность двух чашек Петри с одной из агаризованных селективно-диагностических сред, указанных в 6.2.4, для получения изолированных колоний.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 – 48 ч.

7.3.3 Для определения принадлежности характерных колоний к бактериям рода Listeria отбирают отдельные колонии, выращенные на агаризованных селективно-диагностических средах по 7.3.1, и пересевают бактериологической петлей на среды: МПА с 1 % глюкозы и/или триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA), трипказо-соевый агар (TSA), МПБ с 1 % глюкозы и/или триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB), трипказо-соевый бульон (TSB).

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

Получение чистой культуры проводят по ГОСТ 26670.

На МПА с 1 % глюкозы листерий имеют вид мелких сероватых полупрозрачных колоний.

На триптон-соевом агаре с дрожжевым экстрактом (TSYEA) и трипказо-соевом агаре (TSA) типичные колонии листерий – от 1,0 до 2,0 мм в диаметре, выпуклые, бесцветные, непрозрачные.

На всех указанных средах вид колоний напоминает капли росы.

Рост листерий на средах: МПБ с 1 % глюкозы, триптон-соевом бульоне с дрожжевым экстрактом (TSYEB), трипказо-соевом бульоне (TSB) – характеризуется равномерным помутнением среды, при встряхивании которой наблюдаются так называемые муаровые волны.

7.4 Подтверждение принадлежности выявленных колоний к бактериям рода Listeria

Для подтверждения принадлежности выделенных микроорганизмов к роду Listeria у полученных на средах культивирования чистых культур по 7.3.3 проверяют отсутствие капсул и спор, окраску по Граму, определяют присутствие каталазы (каталазную активность), подвижность бактерий при двух температурах инкубирования: (22 ± 1) °С и (37 ± 1) °С, нитратредуцирующие свойства.

7.4.1 Из посевов по 7.3.3 готовят препараты, окрашивают их по Граму по ГОСТ 30425 (приложение Г.2) и микроскопируют. Бактерии рода Listeria являются грамположительными тонкими короткими палочками, спор и капсул не образуют.

7.4.2 Каталазную активность культур определяют в соответствии с ГОСТ 30425 (приложение Г.1) по способности каталазы разлагать перекись водорода с выделением пузырьков газа.

Бактерии рода Listeria являются каталазоположительными.

7.4.3 Подвижность культур определяют при посеве уколом в среду, приготовленную по 6.2.5.5.

Посевы инкубируют при двух температурах: (22 ± 1) °С и (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

Бактерии рода Listeria подвижны при (22 ± 1) °С, образуют характерный рост вокруг линии укола, похожий на зонтик, и неподвижны или слабоподвижны при (37 ± 1) °С.

7.4.4 Постановку реакции нитратредукции проводят по ГОСТ 10444.8 (4.2.5).

Бактерии рода Listeria не восстанавливают нитраты до нитритов (за исключением непатогенной Listeria grayi).

7.4.5 Обнаружение в посевах грамположительных коротких тонких палочек, каталазоположительных, не восстанавливающих нитраты до нитритов, подвижных при (22 ± 1) °С и неподвижных или слабоподвижных при (37 ± 1) °С, указывает на принадлежность выделенных микроорганизмов к бактериям рода Listeria.

7.5 Подтверждение принадлежности выявленных колоний к виду Listeria monocytogenes

Дифференциацию выделенных культур проводят в два этапа: сначала определяют принадлежность выделенных микроорганизмов к бактериям рода Listeria, а затем подтверждают их принадлежность к виду Listeria monocytogenes.

Определение принадлежности выделенных микроорганизмов к бактериям рода Listeria проводят по 7.4.

Для подтверждения принадлежности выделенных бактерий рода Listeria к виду Listeria monocytogenes у выделенных микроорганизмов определяют ферментативные свойства (способность ферментировать углеводы на средах Гисса с применением маннита, ксилозы, маннозы и рамнозы), β-гемолитическую активность (способность образовывать зоны просветления за счет растворения эритроцитов под или вокруг колоний при посеве на поверхность кровяного агара), лецитиназную активность на средах с активированным углем и без угля, а также дополнительно проводят идентификацию Listeria monocytogenes путем постановки реакции агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой или антительным латексным диагностикумом «Листерия-AG-тест».

Допускается для быстрого определения ферментативных свойств Listeria monocytogenes применять систему биохимической идентификации API Listeria.

Допускается ускоренная идентификация Listeria monocytogenes с применением анализатора типа mini VIDAS, а также дополнительное использование листерийного бактериофага L-3A для идентификации.

7.5.1 Определение ферментативных свойств Listeria monocytogenes

7.5.1.1 Культуры, полученные по 7.3.3, пересевают уколом в среды Гисса по 6.2.5.6. Посевы инкубируют до 7 сут при температуре (37 ± 1) °С, ежедневно проверяя кислото- и газообразование. Наличие ферментативной активности в отношении углеводов определяют по изменению окраски сред за счет образования кислоты и/или газа. При появлении этих признаков проводят учет результатов. Большинство бактерий рода Listeria не ферментируют маннит (за исключением Listeria grayi).

Listeria monocytogenes ферментируют маннозу и рамнозу с образованием кислоты и не ферментируют маннит и ксилозу (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика видов бактерий рода Listeria

Признак	L. monocyto-genes	L. ivanovii	L. seeligeri	L. innocua	L. grayi	L. welshimeri
Ферментация:						
маннита	–	–	–	–	+	–
ксилозы	–	+	+	–	–	+
маннозы	+	+	+	–	+	–
рамнозы	+	–	–	±	+	±
β-гемолиз	+	+	+	–	–	–
КАМП-тест	+	+	+	–	–	–
Усиление гемолиза около культур:						
Rh. equi	–	+	–	–	–	–
St. aureus	+	–	+	–	–	–
Гидролиз лецитина:						
без угля	–	+	–	–	–	–
с углем	+	+	–	–	–	–

7.5.1.2 Определение ферментативных свойств Listeria monocytogenes с помощью системы биохимической идентификации API Listeria

При этом бактериологической петлей выделяют изолированную колонию листерий, выращенную на Оксфордском агаре или ПАЛКАМ агаре (PALCAM agar) в соответствии с 7.3.2, и вносят в пробирку с 2 $см^3$ дистиллированной воды для приготовления суспензии по стандарту мутности, эквивалентной 1 ЕД по шкале Макфарланда.

Приготовленную суспензию вносят пастеровской пипеткой по 0,05 $см^3$ в лунки полоски системы API Listeria, содержащие: ESC (эскулин), α-MAN (маннит), DARL (D-арабитол), XYL (ксилоза), RHA (рамноза), MDG (α-метил-D-глюкоза), RIB (рибоза), G1P (глюкоза-1-фосфат) и TAG (D-тагатоза), избегая образования пузырьков газа. Параллельно вносят пастеровской пипеткой 0,1 $см^3$ суспензии в лунку DIM полоски набора системы API Listeria для идентификации Listeria monocytogenes от Listeria innocua.

Полоски набора, на которые нанесена суспензия, инкубируют при температуре 35 °С – 37 °С в аэробных условиях в течение 18 – 24 ч и визуально учитывают результаты цветообразования по степени окраски суспензии путем сравнения с данными таблицы 2.

Заключение о наличии Listeria monocytogenes делают на основании сравнения изменений цветообразования в лунках полоски системы API Listeria с данными таблицы 2 в разделе позитивной оценки.

Таблица 2 – Характеристика Listeria monocytogenes по изменению цветообразования в лунках системы API Listeria

Тесты	Реакция	Оценка цветообразования	
		негативная	позитивная
DIM	Дифференциация L.monocytogenes от L.innocua	Бледно-оранжевый, бежево-розовый, бежево-серый	Оранжевый
ESC	Гидролиз	Бледно-желтый	Черный
α-MAN	Гидролиз	Бесцветный	Желтый
DARL	Кислотообразование	Красный	Желтый
XYL	Кислотообразование		
RHA	Кислотообразование		
MDG	Кислотообразование		
RIB	Кислотообразование	Красно-оранжевый	Желто-оранжевый
G1P	Кислотообразование		
TAG	Кислотообразование		

7.5.2 Определение β-гемолитической активности

7.5.2.1 Для определения β-гемолитической активности выделяют изолированную колонию листерий, полученную по 7.3.3, и высевают бактериологической петлей на поверхность кровяного агара, приготовленного с добавлением стерильной дефибринированной крови животных по 6.2.5.2.

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

Чашки просматривают в проходящем свете и отмечают образование зон β-гемолиза.

Listeria monocytogenes обладает β-гемолитической активностью с образованием узких зон просветления среды под или вокруг колоний.

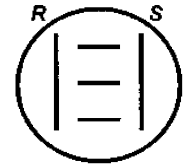
7.5.2.2 Допускается вспомогательно для подтверждения гемолитической активности использовать КАМП-тест (CAMP-test).

7.5.2.2.1 Двухсуточные культуры гемолитических штаммов Staphylococcus aureus и Rhodococcus equi высевают на кровяной агар, как показано на рисунке 1. Между вертикальными линиями Staphylococcus aureus и Rhodococcus equi, как показано на рисунке 1, засевают параллельными линиями исследуемые культуры на расстоянии друг от друга не менее 1 см и от вертикальных линий – 0,5 см.

7.5.2.2.2 Желательно для контроля сделать посев тест-штамма Listeria monocytogenes 766 аналогично посеву исследуемых культур по 7.5.2.2.1.

7.5.2.2.3 Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Отмечают изменение (расширение и просветление) зоны гемолиза в зонах, соседствующих с вертикальными штрихами стафилококка и родококка.

Listeria monocytogenes дает положительную КАМП-реакцию (расширение и просветление зоны гемолиза) около штриха Staphylococcus aureus и отрицательную (отсутствие изменений зоны гемолиза) – около штриха Rhodococcus equi.



R и *S* – культуры Rhodococcus equi и Staphylococcus aureus соответственно;
параллельные горизонтальные линии – исследуемые культуры

Рисунок 1 – Схема посева при постановке КАМП-теста

7.5.3 Определение лецитиназной активности

7.5.3.1 Дно чашек Петри делят на несколько секторов или квадратов и исследуемые культуры, полученные по 7.3.3, высевают короткими штрихами по одной на сектор (квадрат). Засев каждой исследуемой культуры проводят параллельно на чашки, содержащие и не содержащие уголь.

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

Чашки просматривают в проходящем свете и отмечают наличие (отсутствие) лецитиназной активности на чашках, содержащих и не содержащих активированный уголь.

Listeria monocytogenes дает плотную зону помутнения шириной 3,0 – 6,0 мм на питательной среде с активированным углем за счет гидролиза лецитина.

Listeria monocytogenes гидролизует лецитин только в присутствии активированного угля. На среде, не содержащей активированный уголь, Listeria monocytogenes не обладает лецитиназной активностью (таблица 1).

7.5.3.2 Желательно для контроля сделать посев тест-штамма Listeria monocytogenes 766 аналогично посеву исследуемых культур по 7.5.3.1.

7.5.4 Постановка реакции агглютинации для идентификации Listeria monocytogenes

Реакцию агглютинации для идентификации Listeria monocytogenes выполняют на стекле с помощью поливалентной листериозной агглютинирующей сыворотки, содержащей антитела 0-II, V, VI, VII, IX и H-AB.

Предназначенную для идентификации чистую культуру, выращенную в течение 24 ч в питательном бульоне по 7.3.3 при (37 ± 1) °С, засевают бактериологической петлей частым штрихом в две пробирки с МПА с 1 % глюкозы и выдерживают в течение 24 – 30 ч при температуре (22 ± 1) °С в темном

месте. Культуру, выращенную на МПА с 1 % глюкозы, смывают небольшим количеством физиологического раствора, чтобы получить густую взвесь (10 – 15 млрд. клеток в 1 $см^3$).

Реакцию агглютинации ставят на чистых обезжиренных предметных стеклах.

На предметное стекло наносят две капли: каплю поливалентной сыворотки и каплю физиологического раствора. К обеим каплям добавляют по одной капле смыва культуры, выращенной на МПА с 1 % глюкозы. Смесь тщательно и быстро перемешивают бактериологической петлей или запаянным концом пастеровской пипетки, после чего стекло плавно покачивают круговыми движениями. Одновременно ставят контрольный опыт: на предметное стекло наносят каплю поливалентной сыворотки и добавляют к ней каплю физиологического раствора.

Учет результатов реакции агглютинации проводят в течение 3 мин, отмечая появление хлопьев в капле с сывороткой. Запоздалые реакции не учитывают.

Реакцию агглютинации считают положительной при появлении хлопьев в капле с поливалентной листериозной сывороткой и отрицательной реакцией при отсутствии хлопьев в контроле.

При наличии спонтанной агглютинации реакцию агглютинации ставят повторно по указанной выше методике, но при посеве на МПА с 1 % глюкозы в качестве посевного материала используют культуру, выращенную в МПБ с 1 % глюкозы в течение 24 ч при температуре (22 ± 1) °С, чтобы предотвратить повторную спонтанную агглютинацию.

7.5.5 Определение чувствительности Listeria monocytogenes к листерийному бактериофагу L-3А для идентификации

Допускается дополнительное определение для идентификации Listeria monocytogenes по реакции чувствительности к листерийному бактериофагу L-3А.

Для определения используют агаровую культуру, выращенную по 7.3.3 при температуре (37 ± 1) °С в течение 16 – 18 ч, которую засевают в МПБ с 1 % глюкозы или МПБ с 0,5 % глюкозы. Количество посевного материала должно быть таким, чтобы после встряхивания в пробирке с бульоном образовалась легкая опалесценция. Культуры подращивают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 4 ч. После этого бактериальную взвесь наносят газоном на поверхность подсушенного МПА в чашках Петри. При подсушивании чашки открывают и переворачивают вверх дном. Агар, разлитый накануне, подсушивают 20 – 30 мин при комнатной температуре, а разлитый в день исследования – 1 – 1,5 ч при температуре (37 ± 1) °С.

В одной чашке можно одновременно проводить анализ четырех культур. Для этого поверхность агара делят на четыре сектора. На каждый сектор наносят по 0,1 $см^3$ исследуемой культуры и равномерно распределяют отдельным шпателем по отмеченному участку поверхности плотной питательной среды. Чашки с засеянными культурами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 1,0 – 1,5 ч.

Перед применением листерийного бактериофага L-3А содержимое ампул растворяют в пробирке с МПБ с 1 % глюкозы в объеме, указанном на этикетке ампулы, и переносят в пробирки с соблюдением правил асептики. Растворенный бактериофаг не пригоден к использованию при наличии осадка, хлопьев или помутнения.

Неиспользованный в день исследования растворенный бактериофаг хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С в течение 5 – 10 сут и применяют в дальнейшей работе после предварительной проверки на отсутствие бактериального загрязнения по [5].

Всю лабораторную посуду, в которой содержался бактериофаг, а также выбракованный бактериофаг и посевы после их учета обезвреживают кипячением не менее 30 мин.

Для исследования литического действия бактериофага на культуру листерий с целью ее идентификации на газон испытуемой культуры пастеровской пипеткой или бактериологической петлей наносят по одной капле бактериофага и отдельно каплю стерильного МПБ (контроль).

Место нанесения каждой капли отмечают карандашом по стеклу с наружной стороны чашки. Расстояние между наносимыми каплями должно быть не менее 1 см. Чашки после нанесения бактериофага и бульона оставляют при комнатной температуре (22 ± 1) °С в затемненном месте.

Учет результатов проводят через 16 – 24 ч. Культуру признают Listeria monocytogenes, если в месте нанесения бактериофага образуется прозрачная зона лизиса или полусливной лизис (в виде губки). Допускается наличие единичных колоний или сплошного нежного роста вторичной культуры в зоне лизиса при интенсивном бактериальном росте на остальной поверхности агара. В месте нанесения капли стерильного бульона (контроль) зона лизиса должна отсутствовать.

7.5.6 Постановка реакции пассивной агглютинации для идентификации Listeria monocytogenes

Дополнительно для идентификации культуры, выращенной по 7.3.3, допускается использовать иммунодисперсный антительный латексный диагностикум «Листерия-AG-тест» на основе синтетических окрашенных, монодисперсных, функциональных микросфер.

Принцип метода состоит в специфической иммуноагглютинации микросфер, сенсибилизированных листерийными антителами.

При постановке реакции пассивной агглютинации на слайдах учет реакции проводят в течение 3 мин при образовании в капле ярко выраженных хлопьев, свидетельствующих о положительном результате.

При постановке реакции пассивной агглютинации в лунках полистироловых планшетов учет результатов проводят визуально через 2 – 3 ч после постановки реакции. Положительным результатом наличия Listeria monocytogenes считают тот, если в лунке планшета агглютинат имеет форму «зонтика» или равномерно распределен на дне. Отрицательным считают результат, если агглютинат оседает на дне лунки в виде колечка диаметром 1,0 – 1,5 мм или пуговки. Полученные результаты сравнивают с контрольными образцами, включенными в набор.

Реакцию на слайдах и полистироловых планшетах учитывают при отрицательном результате с негативным контрольным образцом и при положительном результате с позитивным контрольным образцом, включенных в диагностикум «Листерия-AG-тест».

7.5.7 Идентификация Listeria monocytogenes с помощью иммуноферментного анализатора типа mini VIDAS и применением стрипового набора VIDAS LMO

Для ускоренной идентификации Listeria monocytogenes используют приборы иммуноферментного анализа (ИФА), в том числе типа mini VIDAS.

Для проведения анализа 1,0 $см^3$ обогащенной культуры на полуконцентрированном или концентрированном бульоне Фразера по 6.2.2.2 или 6.2.3.2 помещают в чистую стерильную пробирку и прогревают при температуре (100 ± 1) °С в течение 10 мин. Полученный субстрат в количестве 0,5 $см^3$ добавляют в незапечатанную лунку стрипа VIDAS LMO. Стрип помещают в анализатор. Ввод данных производят в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Все этапы анализа выполняются прибором автоматически.

В случае выдачи анализатором результата Positive делают заключение о наличии в исследуемом образце патогенных листерий. Эти результаты должны быть подтверждены исследованиями, проведенными по разделу 7. Результаты оформляют в соответствии с разделом 8.

8 Обработка результатов

Результат оценивают по каждой пробе отдельно.

В образце констатируют присутствие Listeria monocytogenes, если из среды накопления выделены короткие грамположительные палочки, каталазоположительные, подвижные при (22 ± 1) °С, неподвижные или слабоподвижные при (37 ± 1) °С, гидролизирующие эскулин; ферментирующие с образованием кислоты рамнозу и маннозу, не сбраживающие маннит и ксилозу, обладающие лецитиназной активностью только в присутствии активированного угля и β-гемолитической активностью.

Результаты выявления Listeria monocytogenes в определенной навеске продукта записывают: «Listeria monocytogenes обнаружены в 25 г ($см^3$) (в 50 – 100 г ($см^3$) – для продуктов детского, лечебного и специализированного питания) продукта» или «Listeria monocytogenes не обнаружены в 25 г ($см^3$) (в 50 – 100 г ($см^3$) – для продуктов детского, лечебного и специализированного питания) продукта».

9 Требования безопасности

При исследованиях пищевых продуктов на наличие Listeria monocytogenes руководствуются СП 1.2.731-99 и [20].

Акрифлавин, хлорид лития и циклогексимид, введенные в состав микробиологических питательных сред, являются токсичными веществами. Не допускается их попадание на кожу и в глаза.

Приложение А
(справочное)

Состав питательных сред

А.1 Среды для поддержания выделенных культур и культивирования бактерий рода Listeria

А.1.1 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) *

Состав среды на 1 дм^3, г:
гидролизат казеина ферментативный 17,0
папаиновый отвар соевой муки 3,0
хлорид натрия 5,0
дрожжевой экстракт 6,0
гидрофосфат калия 2,5
глюкоза 2,5
pH ..... 7,3 ± 0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,3 ± 0,2) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.1.2 Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) *

Состав среды на 1 дм^3, г:
гидролизат казеина ферментативный 17,0
папаиновый отвар соевой муки 3,0
хлорид натрия 5,0
дрожжевой экстракт 6,0
гидрофосфат калия 2,5
глюкоза 2,5
агар-агар 15,0
pH ..... 7,3 ± 0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,3 ± 0,2) и стерилизуют в автоклавах при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду разливают в чашки Петри и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.1.3 Трипказо-соевый бульон (TSB) **

Состав среды на 1 дм^3, г:
био-трипказа 17,0
био-сойаза 3,0
хлорид натрия 5,0
дигидрофосфат калия 2,5
декстроза 2,5
pH ..... 7,3 ± 0,1

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,3 ± 0,1) и стерилизуют в автоклавах при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду хранят не более 4 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Допускается использовать трипказо-соевый бульон взамен триптон-соевого бульона с дрожжевым экстрактом по А.1.1.

---

* По прописи фирмы HiMedia Lab. Ltd., Индия.

** По прописи фирмы BioMerieux, Франция.

А.1.4 Трипказо-соевый агар (TSA) *

Состав среды на 1 дм^3, г:
био-трипказа 15,0
био-сойаза 5,0
хлорид натрия 5,0
агар-агар 5,0
pH ..... 7,3 ± 0,1

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,3 ± 0,1) и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду разливают в чашки Петри и хранят не более 47 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Допускается использовать трипказо-соевый агар взамен триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом по А.1.2.

А.2 Среды селективные для предварительного обогащения

А.2.1 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I)

Состав основы среды на 1 дм^3, г:
гидролизат казеина ферментативный 10,0
пептон ферментативный мясной 15,0
гидролизат автолизованных дрожжей 2,0
хлорид натрия 3,5
хлорид лития 3,0
pH ..... 7,0 ± 0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,0 ± 0,2) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Перед употреблением к 1 дм^3 основы среды с соблюдением правил асептики добавляют 4,44 см^3 раствора селективных компонентов. Раствор готовят следующим образом: 10 мг налидиксовой кислоты, 5 мг акрифлавина и 5 мг полимиксина В сульфата** растворяют в 10 см^3 стерильного физиологического раствора.

Приготовленную среду разливают в стерильные колбы по 225 см^3 и хранят не более 2 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.2.2 Полуконцентрированный бульон Фразера (Half Fraser broth)

А.2.2.1 Состав основы среды *** на 1 дм^3, г:
гидролизат казеина ферментативный 5,0
пептический отвар животной ткани 5,0
дрожжевой экстракт 5,0
хлорид натрия 20,0
дигидрофосфат калия 1,35
гидрофосфат натрия 12,0
эскулин 1,0
хлорид лития 3,0
цитрат аммонийного железа 0,5
pH ..... 7,2 ± 0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,2 ± 0,2) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Перед употреблением к 1 дм^3 основы среды с соблюдением правил асептики добавляют селективные компоненты: 10 мг налидиксовой кислоты и 12,5 мг акрифлавина, растворенные в 10 см^3 стерильного раствора гидроокиси натрия концентрации 0,2 г/дм^3.

---

* По прописи фирмы BioMerieux, Франция.

** Допускается применение других веществ, обладающих аналогичными ингибиторными свойствами.

*** По прописи фирмы HiMedia Lab. Ltd., Индия.

Приготовленную среду разливают в стерильные колбы (по 225 см^3) и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 6 °С.

А.2.2.2 Состав среды (готовая форма, 225 см^3) * на 1 дм^3, г:

пептон 10,0
мясной экстракт 5,0
дрожжевой экстракт 5,0
хлорид натрия 20,0
дигидрофосфат калия 1,35
гидрофосфат натрия 12,0
эскулин 1,0
хлорид лития 3,0
цитрат аммонийного железа 0,5
акрифлавин 0,0125
налидиксовая кислота 0,01
pH ..... 7,3 ± 0,1

Среду хранят не более 6 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С. Допускается использовать полуконцентрированный бульон Фразера взамен ПБЛ I по А.2.1.

А.3 Среды селективные для обогащения

А.3.1 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II)

Состав основы среды на 1 дм^3, г:

гидролизат казеина ферментативный 10,0
пептон 15,0
гидролизат автолизованных дрожжей 2,0
хлорид лития 3,0
хлорид натрия 3,5
pH ..... 7,0 ± 0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,0 ± 0,2) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Перед употреблением к 1 дм^3 основы среды с соблюдением правил асептики добавляют 4,44 см^3 раствора селективных компонентов. Раствор готовят следующим образом: 10 мг налидиксовой кислоты, 5 мг акрифлавина и 5 мг полимиксина В сульфата ** растворяют в 5 см^3 стерильного физиологического раствора.

Приготовленную среду разливают в стерильные пробирки (по 10 см^3) и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.3.2 Бульон Фразера (Fraser broth)

А.3.2.1 Состав основы среды *** на 1 дм^3, г:

гидролизат казеина ферментативный 5,0
пептический отвар животной ткани 5,0
дрожжевой экстракт 5,0
хлорид натрия 20,0
дигидрофосфат калия 1,35
гидрофосфат натрия 12,0
эскулин 1,0
хлорид лития 3,0
цитрат аммонийного железа 0,5
pH ..... 7,2 ± 0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,2 ± 0,2) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

---

* По прописи фирмы BioMerieux, Франция.

** Допускается применение других веществ, обладающих аналогичными ингибиторными свойствами.

*** По прописи фирмы HiMedia Lab. Ltd., Индия.

Перед употреблением к 1 дм^3 основы среды с соблюдением правил асептики добавляют селективные компоненты: 100 мг налидиксовой кислоты и 250 мг акрифлавина, растворенные в 10 см^3 стерильного раствора гидроокиси натрия концентрации 0,2 г/дм^3.

Приготовленную среду разливают в стерильные пробирки по 10 см^3 и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 6 °С.

А.3.2.2 Состав среды (готовая форма, 10 см^3) * на 1 дм^3, г:

пептон	10,0
мясной экстракт	5,0
дрожжевой экстракт	5,0
хлорид натрия	20,0
буферная смесь	13,35
эскулин	1,0
хлорид лития	3,0
цитрат аммонийного железа	0,5
акрифлавин	0,025
налидиксовая кислота	0,02
pH	7,3 ± 0,1

Среду хранят не более 6 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С. Допускается использовать бульон Фразера взамен ПБЛ II по А.3.1.

А.4 Среды селективно-диагностические

А.4.1 Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ)

Состав основы среды на 1 дм^3, г:

гидролизат казеина панкреатический	10,0
гидролизат рыбной муки панкреатический	15,0
гидролизат автолизованных дрожжей	2,0
хлорид натрия	3,5
хлорид лития	15,0
цитрат аммонийного железа	0,5
эскулин	0,8
агар-агар	13,0
pH	7,2 ± 0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,0 ± 0,2) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

К 1 дм^3 стерильной расплавленной основы среды добавляют с соблюдением правил асептики 4,44 см^3 раствора селективных компонентов. Раствор готовят следующим образом: 0,02 г налидиксовой кислоты, 0,01 г полимиксина В сульфата ** и 0,01 г акрифлавина растворяют в 10 см^3 стерильной дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

Приготовленную питательную среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.4.2 Оксфордский агар (Oxford agar)

А.4.2.1 Состав основы среды *** на 1 дм^3, г:

пептон	23,0
крахмал кукурузный	1,0
хлорид натрия	5,0
эскулин	1,0
хлорид лития	15,0
цитрат аммонийного железа	0,5
агар-агар	10,0
pH	7,0 ± 0,2

* По прописи фирмы BioMerieux, Франция.

** Допускается применение других веществ, обладающих аналогичными ингибиторными свойствами.

*** По прописи фирмы HiMedia Lab. Ltd., Индия.

Компоненты растворяют при нагревании в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH (7,0 ± 0,2) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

К 1 дм^3 стерильной расплавленной основы среды добавляют с соблюдением правил асептики селективные компоненты: 0,005 г акрифлавина, 0,02 г колистина, 0,4 г циклогексимида, 0,01 г фосфомицина, 0,002 г цефотетана, растворенные в 10 см^3 стерильной дистиллированной воды.

Приготовленную питательную среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.4.2.2 Состав среды (готовая форма) * на 1 дм^3, г:

пептон	23,0
крахмал	1,0
хлорид натрия	5,0
эскулин	1,0
хлорид лития	15,0
цитрат аммонийного железа	0,5
акрифлавин	0,005
колистин	0,02
циклогексимид	0,4
цефотетан	0,002
фосфомицин	0,01
агар-агар	10,0
pH	7,0 ± 0,1

Среду хранят не более 6 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С. Допускается использовать Оксфордский агар взамен среды ПАЛ по А.4.1.

А.4.3 ПАЛКАМ агар (PALCAM agar)

А.4.3.1 Состав основы среды ** на 1 дм^3, г:

пептон	23,0
крахмал	1,0
хлорид натрия	5,0
эскулин	0,8
хлорид лития	15,0
цитрат аммонийного железа	0,5
глюкоза	0,5
маннит	10,0
феноловый красный	0,08
агар-агар	13,0
pH	7,0 ± 0,2

Компоненты растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Устанавливают pH (7,0 ± 0,2) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

К 1 дм^3 стерильной расплавленной основы среды добавляют с соблюдением правил асептики селективные компоненты: 0,005 г акрифлавина, 0,01 г полимиксина В, 0,02 г цефтазидина, растворенные в 10 см^3 стерильной дистиллированной воды.

Приготовленную питательную среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.4.3.2 Состав среды (готовая форма) * на 1 дм^3, г:

пептон	23,0
дрожжевой экстракт	3,0
хлорид натрия	5,0
эскулин	0,8
хлорид лития	15,0
цитрат аммонийного железа	0,5
декстроза	0,5
маннит	10,0

* По прописи фирмы BioMerieux, Франция.

** По прописи фирмы HiMedia Lab. Ltd., Индия.

феноловый красный 0,08
полимиксин В сульфат 0,01
цефтазидин 0,02
агар-агар 10,0
pH ..... 7,2 ± 0,1

Среду хранят не более 6 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Допускается использовать ПАЛКАМ агар взамен среды ПАЛ по А.4.1.

А.5 Среда для изучения биологических свойств при идентификации листерий

А.5.1 Полужидкая питательная среда для определения подвижности листерий (Listeria motility medium) *

Состав среды на 1 дм^3, г:

гидролизат казеина ферментативный 20,0
пептон 6,1
хлорид натрия 5,0
агар-агар 3,5
pH ..... 7,3 ± 0,2

Компоненты растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, кипятят до полного растворения среды и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.6 Требования к микробиологическим питательным средам и биологическим препаратам

Питательные среды и биологические препараты должны вырабатываться по *ТНПА* и технической документации, утвержденной в установленном порядке.

Допускается использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с настоящим стандартом. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000.

* По прописи фирмы HiMedia Lab. Ltd., Индия.

Приложение Б
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 64-1-33-29-81 Дозаторы пипеточные

[2] ТУ 4215-001-13245171-97 pH-метр модели 2696. – М. : ТОО «Замер», 1997

[3] ТУ 64-2-375-86 Слайды и полистироловые планшеты. Технические условия

[4] ТУ 4215-002-13245171-01 Термометр цифровой «Замер-1». – М. : ООО «Измерительная техника», 2001

[5] ТУ 46-20-1457-83 Набор листерийных бактериофагов сухих для идентификации листерий и постановки реакции нарастания титра фага

[6] ВФС 42-2988-97 Антительный латексный диагностикум для выделения листерий «Листерия-AG-тест». Минздрав РФ, 1997

[7] Регистрационное удостоверение № 97/496 Комплекс средств для определения антибиотикочувствительности и идентификации микроорганизмов. – Фирма «Биомерье» (BioMerieux), Франция. Минздрав РФ/19.05.97

[8] ТУ 46-21-1542-85 Набор сывороток для типизации листерий. – Ставропольская биофабрика, 1985

[9] МУК 4.2.577-96 Методы контроля, биологические и микробиологические факторы. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов. Методические указания

[10] Инструкция по санитарно-бактериологическому контролю производства маргарина и майонеза на предприятиях маргариновой промышленности. – Госагропром СССР, М., 21.11.88

[11] Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных № 5319-81 от 22.02.91

[12] Руководство по выявлению и определению патогенных листерий в свежей, охлажденной и мороженой рыбе. – Госкомрыболовства РФ, 2000

[13] Инструкция по микробиологическому контролю быстрозамороженной плодоовощной продукции. – МЗ СССР, М., 29.09.89

[14] ISO 11290-2:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes.
Part 2. Enumeration method
(Микробиология продуктов питания и животных кормов. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета микроорганизмов Listeria monocytogenes. Часть 2. Метод подсчета)

[15] Регистрационное удостоверение № 98/267 Набор реактивов для микробиологических исследований. – Фирма «Биомерье» (BioMerieux), Франция. Минздрав РФ/23.02.98

[16] ТУ 9385-670-00419779-2001 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ)

[17] Регистрационное удостоверение № 98/1589 Сухие питательные среды производства фирмы HiMedia (Индия). – Минздрав РФ/17.12.98

[18] ТУ 9385-669-00419779-2001 Питательный агар для выделения и культивирования листерий (ПАЛ)

[19] ВФС 42-2988-97 Среда питательная ГРМ № 1 для контроля микробной загрязненности, сухая (для выращивания бактерий). – Минздрав РФ, 1997

[20] Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Минздрава СССР, утвержденные в 1981 г.

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному национальному стандарту Российской Федерации

Таблица Д.А.1

Обозначение и наименование ссылочного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование государственного стандарта
ГОСТ Р 51447-2001 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб	IDT	СТБ ГОСТ Р 51447-2001 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 05.04.2011. Подписано в печать 25.04.2011. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 2,67 Уч.- изд. л. 1,36 Тираж 30 экз. Заказ 783

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru