МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31468— 2012

МЯСО ПТИЦЫ, СУБПРОДУКТЫ И ПОЛУФАБРИКАТЫ ИЗ МЯСА ПТИЦЫ

Метод выявления сальмонелл

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВНИИПП» Россельхозакадемии) и Некоммерческой организацией «Российский птицеводческий союз» (НО «Росптицесоюз»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 23—24 мая 2012 г. № 41)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 14 ноября 2012 г. № 806-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31468—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 53665—2009

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта публикуется в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты».

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты»

© Стандартинформ, 2013

В Российской Федерации 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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЯСО ПТИЦЫ, СУБПРОДУКТЫ И ПОЛУФАБРИКАТЫ ИЗ МЯСА ПТИЦЫ

Метод выявления сальмонелл

Poultry meat, edible offal and poultry meat ready-to-cook.
Method for detection of Salmonellae

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы (далее — продукт) и устанавливает метод выявления сальмонелл (далее — бактерий рода Salmonella).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартной безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартной безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79 Система стандартной безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 5962—67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

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

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

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

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

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 28560—90 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов Proteus, Morganella, Providensia

ГОСТ 29227—91 (ISO 835-1:81) Посуда лабораторная, стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31659—2012 (ISO 6579:2002) Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по указателю «Национальные стандарты», составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **сальмонеллы (бактерии рода Salmonella):** Грамотрицательные неспорообразующие, подвижные (кроме S. pullorum, S. galinarum) палочки, ферментирующие глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа и не ферментирующие лактозу и сахарозу.

3.2

выявление бактерий рода Salmonella: Определение присутствия или отсутствия бактерий рода Salmonella в определенной массе продукта в соответствии с настоящим стандартом.

[ГОСТ 31659, пункт 3.2]

4 Сущность метода

Метод основан на высеве определенного количества продукта в жидкие неселективные и селективные среды с последующим высевом на агаризованные дифференциально-диагностические среды, выделением чистых культур, имеющих типичные для бактерий рода Salmonella морфологические, культуральные признаки, и последующей их идентификацией по биохимическим свойствам и серологическим реакциям.

5 Общие положения

5.1 Общие требования проведения микробиологических исследований — по ГОСТ ISO 7218.

5.2 Требования безопасности при работе с микроорганизмами — по документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт; с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007; с электрооборудованием — по ГОСТ 12.1.019; требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

5.3 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218.

6 Средства измерений, аппаратура, материалы и реактивы

6.1 Аппаратура, материалы и реактивы по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ 7702.2.0 со следующими дополнениями:

посуда одноразовая для микробиологических исследований;

пипетки градуированные или автоматические вместимостью 10, 2, 1 $см^3$ с градуировкой 0,5 и 0,1 $см^3$ по ГОСТ 29227;

дозаторы для розлива питательных сред;

петля бактериологическая (1мкл);

пипетки пастеровские;

весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,01 мг (для взвешивания реактивов);

весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 1000 г, с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ± 20,0 мг (для взвешивания продукта);

чашки Петри пластиковые среднего размера (диаметр 90 или 100 мм) и/или большие (диаметр 140 мм) однократного применения;

бумага крепированная;

крафт-бумага;

пробки силиконовые, резиновые;

пеналы для стерилизации лабораторной посуды;

пакеты бумажные самоклеящиеся с индикаторами для паровой и воздушной стерилизации «ПС» (для упаковывания изделий медицинского назначения перед стерилизацией);

материал пластиковый рулонный без складок с индикаторами для паровой и воздушной стерилизации (для упаковывания изделий медицинского назначения перед стерилизацией);

аппарат термосварочный ротационного или импульсного типа для запечатывания упаковок для стерилизации.

6.2 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и аппаратуры с техническими характеристиками, а также реактивов и материалов по качеству не ниже указанных в 6.1.

7 Подготовка к проведению исследования

7.1 Отбор и подготовка проб

Отбор и подготовка проб по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ 7702.2.0 со следующим дополнением:

«проба для проведения испытаний должна быть представительной, не поврежденной и не измененной в процессе транспортирования и временного хранения».

7.2 Подготовка посуды

7.2.1 Подготовка посуды, предназначенной для проведения микробиологических исследований, должна гарантировать ее чистоту и стерильность вплоть до ее использования.

7.2.2 Лабораторную посуду (колбы, стаканы) закрывают ватно-марлевыми, силиконовыми пробками, выдерживающими стерилизацию сухим жаром или автоклавированием, покрывают колпачком из бумаги (см. 6.1), который обвязывают ниткой.

Пробирки закрывают ватно-марлевыми или силиконовыми, резиновыми пробками (см. 6.1). Пробирки, чашки Петри в закрытом виде, пипетки со вставленными ватными тампонами перед стерилизацией помещают в упаковку для стерилизации (металлические пеналы, бумажные пакеты, пакеты и рулонный материал комбинированные) или обертывают бумагой (крафт-бумагой, крепированной бумагой), предназначенной для стерилизации и хранения стерильного материала.

Бумага, используемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации и хранении.

7.2.3 Режим стерилизации посуды — по ГОСТ 26668.

7.2.4 Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах. На упаковке должна быть указана дата стерилизации и сроки хранения упакованной стерильной посуды.

7.2.5 Контроль посуды на стерильность проводят не реже одного раза в квартал по документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт, на количестве стерилизованной посуды, отобранной от партии не менее трех единиц. Партией считают любое количество посуды, прошедшей стерилизацию за один цикл работы одного стерилизатора.

7.3 Приготовление растворов, реактивов и сывороток

7.3.1 Пептонно-солевой раствор для приготовления разведений по ГОСТ 26669.

7.3.2 Растворы и реактивы для окраски по Граму по ГОСТ 10444.1.

7.3.3 Раствор бриллиантового зеленого концентрации 5 г/дм^3 по ГОСТ 7702.2.0.

7.3.4 Реактивы для реакции Фогес-Проскауера по ГОСТ 31659.

7.3.5 Реактив Эрлиха по ГОСТ 28560.

7.3.6 Реактив Ковача по ГОСТ 28560.

7.3.7 Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

7.3.8 Сухие агглютинирующие адсорбированные О-, Vi-, Н-сальмонеллезные сыворотки.

7.3.9 Диски с углеводами для тестов на ферментацию сахаров.

7.3.10 Толуол.

7.3.11 β-галактозидный реактив по ГОСТ 31659.

7.3.12 Биохимические микротесты со специальной адаптированной базой данных;

7.3.13 Физиологический раствор по ГОСТ 7702.2.0.

7.3.14 Диагностикум латексный для серотипирования бактерий рода Salmonella по документу, действующему на территории государства, принявшего стандарт.

7.3.15 Набор для подтверждения идентификации Salmonella с помощью латекс-теста по документу, действующему на территории государства, принявшего стандарт.

7.3.16 Тест-наборы для биохимической идентификации бактерий рода Salmonella.

7.3.17 Тест-штамм бактерий рода Salmonella, не относящийся к тифозной группе.

7.4 Приготовление питательных сред

7.4.1 Пептонно-буферная среда по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.2 Селенитовая обогатительная среда по ГОСТ 31659.
7.4.3 Тетратионатный бульон (Мюллер-Кауфмана) по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.4 Селенит-цистиновый накопительный бульон.
7.4.5 Магниевая среда по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.6 Среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) по ГОСТ 31659.
7.4.7 Модифицированная полужидкая среда MSRV.
7.4.8 Висмут-сульфитный агар.
7.4.9 Среда Плоскирева.
7.4.10 Среда Эндо.
7.4.11 Среда Левина.
7.4.12 Бриллиантово-зеленый агар.
7.4.13 XLD-4 агар.
7.4.14 Агар тройной сахарный.
7.4.15 Агар Кристенсена с мочевиной по ГОСТ 31659.
7.4.16 Бульон Хоттингера по ГОСТ 10444.1.
7.4.17 Среды с углеводами (среды Гисса).
7.4.18 Трехсахарный железистый агар (TSI-агар).
7.4.19 Скошенный столбик мясо-пептонного агара по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.20 Триптон-триптофановая среда по ГОСТ 31659.
7.4.21 Скошенный столбик агара Симмонса по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.22 Среда Клиглера.
7.4.23 Среда SIM для идентификации.
7.4.24 Среда Ресселя — ГРМ.
7.4.25 Среда Олькеницкого.
7.4.26 Среда для реакции Фогес-Проскауера по ГОСТ 31659.
7.4.27 L-лизиндекарбоксилазная среда по ГОСТ 31659.
7.4.28 ONPG-диски для определения β-галактозидазной активности.
7.4.29 Модифицированная полужидкая среда MSRV.
7.4.30 Столбик полужидкого питательного агара по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.31 Мясо-пептонный агар по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.32 Мясо-пептонный бульон с 1 % глюкозы по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.33 Пептонная вода по ГОСТ 7702.2.0.
7.4.34 VP-среда по ГОСТ 31659.
7.4.35 ГРМ-агар.
7.4.36 Допускается использование других готовых и сухих, в том числе хромогенных питательных сред, разрешенных к применению на территории государства, принявшего стандарт, предназначенных для выявления и идентификации бактерий рода Salmonella.
7.4.37 Приготовление и правила использования сред — по прописям производителя.
7.4.38 Каждое опытное употребление питательных сред должно давать гарантию их годности для выявления бактерий рода Salmonella. Стандартные методы контроля бактериологических питательных сред по ГОСТ ISO 11133-1.

7.4.39 Контроль питательных сред на стерильность

Питательные среды проверяют на стерильность путем выдержки в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. Если после этого на плотных питательных средах не обнаруживается колоний микроорганизмов, а в жидких средах нет помутнения или осадка, свидетельствующих о росте микроорганизмов, они считаются стерильными.

7.4.40 Сроки и условия хранения питательных сред — по ГОСТ ISO 11133-1.

8 Проведение исследований

8.1 Предварительное неселективное обогащение

8.1.1 Предварительное неселективное обогащение направлено на выявление в испытуемой пробе небольшого числа бактерий рода Salmonella и поврежденных бактерий рода Salmonella.

8.1.2 Для приготовления исходной суспензии используют неселективную пептонно-буферную среду (см. 7.4.1) или другую среду для предварительного неселективного обогащения (см. 7.4.36).

Для большего эффекта перед внесением навески продукта пептонно-буферную среду или другую среду для предварительного неселективного обогащения нагревают в водяной бане до температуры (37 ± 1) °С.

Подготовленную пептонно-буферную среду или другую среду для предварительного неселективного обогащения инокулируют при комнатной температуре навеской продукта массой (25 ± 0,1) г. Соотношение между количеством высеваемого продукта и количеством неселективной среды 1:10: (25 ± 0,1) г пробы на (225,0 ± 0,1) см^3 среды. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (18 ± 2) ч.

8.1.3 В случае, если масса пробы другая, чем (25 ± 1) г, соотношение между количеством высеваемого продукта и количеством неселективной среды 1:10.

В случае если исследуют больше одной пробы от определенного продукта и когда очевидно, что объединенная навеска не влияет на результат испытания, то для уменьшения объема работы навески объединяют, соблюдая при посеве соотношение между массой общей навески и количеством неселективной среды 1:10.

8.2 Селективное обогащение

8.2.1 Культуры из среды для предварительного неселективного обогащения по 8.1 пересевают в две среды для селективного обогащения.

Для этого 0,1 см^3 культуры, полученной по 8.1.2, пересевают в (10,0 ± 0,1) см^3 среды Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) (см. 7.4.6) и 1,0 см^3 культуры, полученной по 8.1.2, пересевают в (10,0 ± 0,1) см^3 в одну из сред: тетратионатный бульон (Мюллер-Кауфмана) (см. 7.4.3), селенитовую обогатительную (см. 7.4.2), селенит-цистиновый накопительный бульон (см. 7.4.4), магниевую (см. 7.4.5), модифицированную полужидкую среду MSRV (см. 7.4.7) или другую среду для селективного обогащения (см. 7.4.36).

Посевы на RVS-бульоне инкубируют при температуре (41,5 ± 1,0) °С в течение (24 ± 3) ч.

Посевы на тетратионатном бульоне (Мюллер-Кауфмана), магниевой, селенитовой обогатительной, селенит-цистиновых средах инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

При посеве на модифицированную полужидкую среду MSRV 0,1 см^3 культуры из среды для предварительного неселективного обогащения пересевают на поверхность MSRV среды. Для большей селективности допускается распределить посевную дозу (0,1 см^3) на три точки внесения по центру чашки Петри. Посевы на модифицированной полужидкой среде MSRV инкубируют в течение (24 ± 3) ч при температуре (41,5 ± 1,0) °С. Чашки Петри не переворачивают. При отсутствии роста через (24 ± 3) ч посевы дополнительно инкубируют в течение (24 ± 3) ч. Для подвижных штаммов сальмонелл характерен диффузный рост в толще этой среды от центра к периферии.

8.2.2 На других средах (см. 7.4.36), предназначенных для селективного обогащения, посевы инкубируют при температуре и с экспозицией по инструкции по их применению.

8.2.3 Прямой посев в среды для селективного обогащения

Продукты свежие, которые не были подвергнуты каким-либо физическим воздействиям (сушке, заморозке и другим воздействиям), допускается высевать непосредственно в селективные среды, исключая этап предварительного неселективного обогащения.

Соотношение между количеством высеваемого продукта и количеством селективной среды 1:10:(25,0 ± 0,1) г пробы на (225,0 ± 0,1) см^3 среды. В случае объединения навески продукта — по 8.1.3.

8.3 Выделение чистой культуры на дифференциально-диагностических агаризованных средах и идентификация

8.3.1 Для выделения чистой культуры после инкубирования на селективных средах по 8.2 проводят высев посевного материала на две агаризованные дифференциально-диагностические среды: на XLD-агар (см. 7.4.13) и на одну из сред: висмут-сульфитный агар (см. 7.4.8), среду Плоскирева (см. 7.4.9), среду Эндо (см. 7.4.10), среду Левина (см. 7.4.11), бриллиантово-зеленый агар (см. 7.4.12).

Для получения отдельных хорошо изолированных колоний бактериологической петлей (1 мкл) берут минимальное количество посевного материала и проводят высев штрихом по ГОСТ 26670 на поверхность чашек Петри с подсушенными дифференциально-диагностическими средами.

С модифицированной полужидкой MSRV среды (см. 8.2.1) бактериологической петлей (1 мкл) берут материал с границы зоны диффузного роста, осторожно касаясь поверхности среды, не захватывая сам агар, и переносят на поверхность дифференциальной среды штрихом по ГОСТ 26670.

Чашки Петри с посевами переворачивают вверх дном, помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С и инкубируют в течение (24 ± 3) ч. Предварительный учет результатов проводят через (24 ± 3) ч, окончательный — через (48 ± 3) ч.

8.3.2 После инкубирования проводят просмотр чашек Петри на присутствие типичных или не совсем типичных (подозрительных) колоний (при росте на конкретной дифференциально-диагностической среде) для бактерий рода Salmonella. Выбранные колонии отмечают на дне чашки Петри для проведения последующей идентификации.

Бактерии рода Salmonella образуют:

- на XLD-агаре:

колонии с черным центром и слегка прозрачной зоной красноватого цвета, что принадлежит цвету индикатора;

колонии розовые с темным розовым центром (H_2S — отрицательные бактерии рода Salmonella, например S. paratyphi A);

колонии желтые с почернением или без него (лактозоположительные бактерии рода Salmonella);

- на среде Эндо — колонии бесцветные или слегка розоватые;
- на среде Плоскирева — колонии бесцветные прозрачные, но более плотные, чем на среде Эндо;
- на висмут-сульфит агаре:

колонии черные с характерным металлическим блеском (например S. typhi) с пигментированием среды под колониями;

колонии зеленоватые с темно-зеленым ободком или бесцветные без пигментирования среды под колониями;

- на среде Левина — колонии прозрачные, слабо-розовые или розово-фиолетовые;
- на бриллиантовом зеленом агаре:

колонии красноватые или розовые, почти белые (их цвет зависит от штамма и срока инкубирования);

колонии зеленоватые, окруженные яркой желто-зеленой зоной (лактозоположительные и сахарозоположительные штаммы).

8.3.3 При использовании других дифференциально-диагностических сред (см. 7.4.36) для выявления бактерий рода Salmonella особенности роста и характеристики колоний описываются в инструкциях по их применению.

8.3.4 При отсутствии типичных или не совсем типичных (подозрительных колоний) в посевах на дифференциально-диагностических средах работу с посевами прекращают и конечный результат определяют как отсутствие бактерий рода Salmonella в анализируемой навеске (массе, объеме) продукта.

8.3.5 При наличии хотя бы на одной дифференциально-диагностической агаризованной среде колоний типичных или не совсем типичных (подозрительных колоний) для бактерий рода Salmonella проводят отбор колоний для дальнейших исследований.

8.4 Идентификация бактерий рода Salmonella

Для идентификации бактерий рода Salmonella допускается использование наборов тест-систем (см. 7.3.12) промышленного производства, разрешенных к применению на территории государства, принявшего стандарт. Идентификация с использованием наборов тест-систем для идентификации микроорганизмов основана на использовании стандартных биохимических микротестов. Системы используют по инструкции производителя со специальной адаптированной под микротесты базой данных (см. 7.3.12).

Для подтверждения идентификации бактерий рода Salmonella допускается использование латекс-тестов.

Для проведения идентификации бактерий рода Salmonella по биохимическим свойствам и серологическим реакциям используют только чистые культуры.

8.4.1 Отбор и подготовка колоний к идентификации по биохимическим свойствам и серологическим реакциям

С каждой чашки Петри, с дифференциально-диагностической агаризованной среды (см. 8.3.2) отбирают сначала одну колонию, типичную или не совсем типичную (подозрительную), и затем четыре колонии, если первая отрицательная.

Рекомендуется брать сразу пять колоний для идентификации в случае эпидемиологической ситуации. При наличии в одной чашке Петри менее пяти типичных или не совсем типичных (подозрительных) колоний отбирают все типичные или подозрительные колонии.

Отбор материала проводят бактериальной петлей с поверхности и центра колонии, не касаясь поверхности среды. Отобранные колонии переносят в чашки Петри на поверхность предварительно подсушенного мясо-пептонного агара (см. 7.4.31), ГРМ-агара (см. 7.4.35) или на скошенную поверхность мясо-пептонного агара в пробирках (см. 7.4.19).

Чашки Петри или пробирки с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

8.4.2 Окраска по Граму

Из колоний, отобранных для биохимической идентификации, готовят мазки и окрашивают по Граму по ГОСТ ISO 7218. Бактерии рода Salmonella — грамотрицательные палочки с закругленными концами.

При использовании в исследованиях тест-наборов для биохимической идентификации бактерий рода Salmonella окрашивание по Граму не обязательно.

8.4.3 Определение биохимических свойств культуры

Биохимические свойства у отобранных и предварительно пересеянных грамотрицательных культур по 8.4.1 определяют по способности ферментации глюкозы, сахарозы и маннита, расщепления мочевины, образования ацетоина, индола, β-галактозидазы, L-лизиндекарбоксилазы.

Для определения биохимических свойств используют специальные среды: трехсахарный агар Олькеницкого (см. 7.4.25), среды Гисса (см. 7.4.17) либо одну из комбинированных сред: Клиглера (см. 8.4.22), Ресселя-ГРМ (см. 7.4.24) и другие комбинированные среды по 7.4.36.

Для посевов в специальные среды подготовленный материал по 8.4.1 отбирают бактериальной петлей с поверхности и центра колонии, не касаясь поверхности агара. Исследуют не менее трех типичных колоний из каждой чашки.

Полученный материал засевают штрихом по поверхности скошенной среды и уколом по центру столбика в его толщу.

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

8.4.3.1 Определение ферментации сахаров

Для определения ферментации сахаров используют одну из сред по 8.4.3. Посев и инкубирование — по 8.4.3.

Интерпретация результатов по изменениям среды:

Агар Клиглера содержит два сахара, поэтому по скошенной поверхности учитывают только ферментацию лактозы:

- малиновый цвет скошенной поверхности среды указывают на ферментацию лактозы.

Среды Олькеницкого:

- пожелтение самого столбика среды указывает на ферментацию глюкозы (глюкоза положительная);
- пожелтение скошенной поверхности среды указывает на ферментацию лактозы и/или сахарозы (лактоза и/или сахароза положительная);
- красный или неизменившийся столбик среды указывает на отсутствие ферментации глюкозы (глюкоза отрицательная);
- красная или неизменившаяся скошенная поверхность среды указывает на отсутствие ферментации лактозы и/или сахарозы (лактоза и/или сахароза отрицательная);
- пузырьки или разрывы в толще среды указывают на образование газа из глюкозы;
- черный цвет среды указывает на образование сероводорода.

TSI-агар:

- пожелтение поверхности TSI-агара (см. 7.3.18) указывает на ферментацию лактозы (лактоза положительная).

Типичные культуры бактерий рода Salmonella показывают щелочную (красную) поверхность и кислый (желтый) столбик с образованием газа (пузырьков).

Определение ферментации маннита и сахарозы

Для определения ферментации маннита или сахарозы используют среды Гисса (см. 7.4.17) с маннитом или сахарозой. Посев и инкубирование — по 8.4.3.

При ферментации маннита цвет среды изменяется.

Бактерии рода Salmonella: ферментируют глюкозу с образованием кислоты и газа или кислоты без образования газа; ферментируют маннит с образованием кислоты; не ферментируют лактозу и сахарозу.

Определение ферментации сахаров с помощью дисков с углеводами

Для определения ферментации бактериями рода Salmonella сахаров допускается использование дисков с углеводами (см. 7.3.9). Методика проведения испытаний по инструкции производителя.

8.4.3.2 Определение образования сероводорода

Для определения образования сероводорода используют одну из питательных сред: Олькеницкого (см. 7.4.25) или среду Клиглера (см. 7.4.22), или 1 %-ную пептонную воду (см. 7.4.33). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение от 24 до 72 ч.

При посеве культуры в одну из комбинированных сред об образовании сероводорода судят по почернению среды в столбике.

Типичные культуры бактерий рода Salmonella примерно в 90 % случаев образуют сероводород (черный цвет среды).

8.4.3.3 Дальнейшему изучению подвергают культуры с типичными или не совсем типичными свойствами для бактерий рода Salmonella: бактерии, ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа, а также лактозоположительные бактерии и бактерии, не образующие сероводород, но обязательно ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа.

8.4.3.4 Определение расщепления мочевины

При определении расщепления мочевины используют агар Кристенсена с мочевиной (см. 7.4.15), агар тройной сахарный по 7.4.14 или другие среды по 7.4.36.

Культуры засевают штрихом по поверхности скошенной среды в пробирках. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч, периодически наблюдая за посевами (для уреазоположительных бактерий реакция часто становится видимой уже после 2 ч инкубирования).

Агар Кристенсена

Изменение цвета фенолового красного от розового до светло-вишневого свидетельствует о расщеплении мочевины с выделением аммония — положительная реакция.

Отсутствие изменения окраски — отрицательная реакция.

Агар тройной сахарный

Восстановление изменившегося цвета среды при расщеплении глюкозы с красного или желтого до бледно-розового цвета свидетельствует о расщеплении мочевины — положительная реакция.

Отсутствие изменения окраски — отрицательная реакция.

Бактерии рода Salmonella мочевину не расщепляют.

8.4.3.5 Определение образования индола

Для определения образования индола проводят посев в пробирку, содержащую 5 см^3 одной из питательных сред: 1 %-ную пептонную воду (см. 7.4.33), бульон Хоттингера (см. 7.4.16) или в триптон-триптофановую среду (см. 7.4.20). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч.

Пептонная вода

В пробирки с суточной культурой в пептонной воде по стенке добавляют 1 см^3, по каплям, одного из реактивов: Эрлиха (см. 7.3.5) или Ковача (см. 7.3.6).

С реактивом Эрлиха при наличии индола не позднее чем 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.

Бульон Хоттингера, триптон-триптофановая среда

В пробирки с суточной культурой в бульоне Хоттингера (см. 7.3.16) или триптон-триптофановой среде (см. 7.3.20) по стенке добавляют 1 см^3, по каплям, одного из реактивов: Эрлиха (см. 7.3.5) или Ковача по 7.3.6.

Не позднее чем через 5 мин образование темно-красного кольца указывает на образование индола — реакция положительная; коричнево-желтое кольцо — реакция отрицательная.

Бактерии рода Salmonella индола не образуют.

8.4.3.6 Определение образования ацетоина (реакция Фогес-Проскауера)

Для определения способности к образованию ацетоина испытуемую культуру петлей засевают в пробирки с 3 см^3 мясо-пептонного бульона с глюкозой (см. 7.4.32) или VP среды (см. 7.4.34).

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. После инкубации к 1 см^3 отобранной в стерильную пробирку культуральной жидкости прибавляют две капли раствора креатина моногидрата, три капли спиртового раствора 1-нафтола и две капли раствора гидроокиси калия, приготовленные по 7.3.4. Содержимое пробирки перемешивают после прибавления каждого реактива. Появление через 15 мин от розового до светло-красного окрашивания указывает на положительную реакцию. При отрицательной реакции остаток культуральной жидкости инкубируют еще (24 ± 3) ч и тест повторяют.

Определение образования ацетоина допускается проводить без применения раствора креатина. Для этого после инкубирования к 1 см^3 отобранной культуральной жидкости прибавляют только 0,6 см^3 раствора 1-нафтола и 0,2 см^3 раствора гидроокиси калия. После прибавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление розового окрашивания через 15 мин указывает на положительную реакцию. При отрицательной реакции остаток культуральной жидкости инкубируют еще (24 ± 3) ч и тест повторяют.

Бактерии рода Salmonella не образуют ацетоина (реакция Фогес-Проскауера отрицательная).

8.4.3.7 Определение образования L-лизиндекарбоксилазы

Для определения образования L-лизиндекарбоксилазы используют L-лизиндекарбоксилазную среду (см. 7.4.27).

Жидкую L-лизиндекарбоксилазную среду инокулируют снизу бактериальной культурой и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Помутнение и пурпурный цвет среды после инкубирования — положительная реакция.

Желтый цвет среды — отрицательная реакция.

Столбик агаризованной среды с одной из аминокислот инокулируют бактериальной культурой методом укола и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Темно-красная окраска среды — положительная реакция.

Желтый цвет среды — отрицательная реакция.

Salmonella paratyphi A не образует L-лизиндекарбоксилазу, остальные декарбоксилируют лизин и образуют L-лизиндекарбоксилазу.

8.4.3.8 Определение β-галактозидазной активности

В пробирку с 0,25 $см^3$ физиологического раствора петлей суспендируют бактериальную культуру. К полученной суспензии прибавляют одну каплю толуола (см. 7.3.10) и пробирку встряхивают. Пробирку помещают в водяную баню при температуре (37 ± 1) °С и оставляют примерно на 5 мин. Затем добавляют 0,25 $см^3$ β-галактозидный реактив (см. 7.3.11), смешивают содержимое и пробирку помещают в водяную баню или термостат при температуре (37 ± 1) °С до (24 ± 3) ч, наблюдая за изменением цвета через определенные промежутки времени. Изменение цвета может обнаруживаться примерно через 20 мин.

Желтый цвет суспензии — положительная реакция.

Неизменение цвета суспензии через (24 ± 3) ч — отрицательная реакция.

Бактерии рода Salmonella, кроме Salmonella arizonae, не обладают β-галактозидазой.

Для определения β-галактозидазной активности допускается использование ONPG-дисков (см. 7.4.28).

8.4.3.9 Интерпретация результатов биохимических испытаний

Интерпретацию результатов биохимических испытаний культур проводят, пользуясь таблицами биохимических характеристик бактерий рода Salmonella.

8.4.4 Определение подвижности

Для определения подвижности культуру высевают методом укола в пробирку со столбиком полужидкого питательного агара (см. 7.4.30). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

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

Бактерии рода Salmonella подвижны, кроме Salmonella gallinarum и Salmonella pullorum.

Наличие подвижности некоторых штаммов бактерий рода Salmonella представлено в приложении А.

8.4.5 Серологическая идентификация — по ГОСТ 31659 (пункт 8.5.4).

8.4.6 Интерпретация результатов испытаний выявленных культур на биохимические свойства и серологические реакции — по ГОСТ 31659 (пункт 8.5.5).

9 Обработка результатов исследований

9.1 Результаты исследований оценивают по каждой пробе в отдельности.

9.2 Результаты исследований записывают следующим образом: бактерии рода Salmonella обнаружены или не обнаружены в 25 г продукта.

10 Контроль проведения исследований

Для подтверждения достоверности результатов биохимических и серологических исследований выделенных из образцов культур в качестве контроля используют типичный по этим показателям штамм бактерий рода Salmonella. Производители питательных сред, биохимических наборов и быстрых тест-систем могут конкретизировать контрольные бактериальные культуры. При отсутствии конкретизации процедура контроля качества включает культуры бактерий рода Salmonella для целевого использования, отвечающие параметрам, заложенным в тестах исследований.

УДК 663.664.001.4:006.354 МКС 67.120.20

Ключевые слова: мясо птицы, субпродукты, полуфабрикаты, сальмонелла, бактерии рода Salmonella, питательные среды, отбор проб, неселективное обогащение, селективное обогащение, дифференциально-диагностические среды, выделение культур микроорганизмов, биохимические свойства, серологические реакции, контроль микробиологических исследований

Редактор *Н.О. Грач*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 21.05.2013. Подписано в печать 14.06.2013. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,35. Тираж 168 экз. Зак. 618.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru