ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53944— 2010

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЯИЦ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Методы микробиологического анализа

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИПП Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 116 «Продукты переработки птицы, яиц и сублимационной сушки»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 ноября 2010 г. № 479-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Сентябрь 2013 г.

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (gost.ru)

© Стандартинформ, 2011
© Стандартинформ, 2013

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 3
4 Общие положения 4
5 Средства измерений, аппаратура, материалы, реактивы и культуральные среды 4
6 Подготовка к проведению анализов 6
7 Метод выявления и определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) 10
8 Метод выявления бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) 11
9 Метод выявления бактерий рода Salmonella 12
10 Метод выявления бактерий рода Proteus 14
11 Метод выявления бактерий вида Staphylococcus aureus 14
Библиография 16

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЯИЦ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Методы микробиологического анализа

Food products of commercial poultry eggs processing. Microbiological analysis methods

Дата введения — 2011—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы (далее — продукт) и устанавливает методы их микробиологического анализа:

- выявления и определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов;
- выявления бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий);
- выявления бактерий рода Salmonella;
- выявления бактерий рода Proteus;
- выявления бактерий вида Staphylococcus aureus.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 7218—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ Р ИСО 11133-1—2008 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 Р 50396.0—92 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям

ГОСТ Р 51232—98 Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 52121—2003* Яйца куриные пищевые. Технические условия

ГОСТ Р 52814—2007 (ИСО 6579:2002) Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella

ГОСТ Р 52815—2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и Staphylococcus aureus

ГОСТ Р 52816—2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ Р 52833—2007 (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 53669—2009** Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы отбора проб и органолептического анализа

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

* По приказу № 609-ст от 28.08.2013 продлен срок действия ГОСТ Р 52121—2003 до 15.02.2015.

** Отменен, с 15.02.2015 пользоваться ГОСТ 31720—2012.

Издание официальное

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

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

ГОСТ 83—79 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия

ГОСТ 171—81 Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия

ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 779—55** Мясо — говядина в полутушах и четвертинах. Технические условия

ГОСТ 1027—67 Реактивы. Свинец (II) уксуснокислый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия

ГОСТ 2493—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

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

ГОСТ 4148—78 Реактивы. Железо (II) сернокислое 7-водное. Технические условия

ГОСТ 4159—79 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4170—78 Реактивы. Натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный 4-водный. Технические условия

ГОСТ 4172—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4201—79 Реактивы. Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4208—72 Реактивы. Соль закиси железа и аммония двойная сернокислая (соль Мора). Технические условия

ГОСТ 4209—77 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4232—74 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4523—77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4530—76 Реактивы. Кальций углекислый. Технические условия

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

ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5833—75 Реактивы. Сахароза. Технические условия

ГОСТ 6038—79 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6824—96 Глицерин дистиллированный. Технические условия

ГОСТ 8253—79 Мел химически осажденный. Технические условия

ГОСТ 8273—75 Бумага оберточная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9285—78 Калия гидрат окиси технический. Технические условия

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

ГОСТ 10929—76 Реактивы. Водорода пероксид. Технические условия

ГОСТ 11078—78 Натр едкий очищенный. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 19342—73 Печень крупного рогатого скота и свиней замороженная. Технические условия

ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 21240—89 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 54315—2011.

ГОСТ 22180—76 Реактивы. Кислота щавелевая. Технические условия

ГОСТ 22280—76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

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

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

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

ГОСТ 27068—86 Реактивы. Натрий серноватистокислый (натрия тиосульфат) 5-водный. Технические условия

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29228—91 (ИСО 835-2—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

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 неспорообразующие подвижные (кроме S. pullorum, S. gallinarum) палочки, ферментирующие глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа и не ферментирующие лактозу и сахарозу.

[ГОСТ Р 53665—2009, статья 3.1]

3.1.2 **бактерии группы кишечных палочек (колиформные бактерии):** Грамотрицательные неспорообразующие палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при (37 ± 10) °С, как цитратотрицательные, так и цитратположительные, включая роды — Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacteria, Citrobacter, Serratia.

3.1.3 **бактерии вида Staphylococcus aureus** (далее — **St. aureus):** Грамположительные кокки, неподвижные, спор и капсул не образуют, располагаются гроздевидно, одиночно или попарно, аэробы и факультативные анаэробы; продуцируют каталазу, уреазу, аммиак и сероводород, сбраживают лактозу, мальтозу, маннит, сахарозу, дают положительную реакцию плазмокоагуляции.

3.1.4 **бактерии рода Proteus:** Грамотрицательные прямые подвижные бескапсульные палочки, полиморфные (нитевидные и кокковидные формы), факультативные анаэробы; сбраживают глюкозу и некоторые углеводы с образованием кислоты и, обычно, газа, оксидазо-отрицательные, каталазо-положительные, обычно образуют сероводород, гидролизуют мочевину, восстанавливают нитраты.

3.1.5

культуральная среда: Перечень ингредиентов в жидкой, полужидкой или в твердой формах, которые содержат натуральные и/или синтетические компоненты для того, чтобы поддерживать размножение или сохранять жизнеспособность микроорганизмов.

[ГОСТ Р ИСО 11133-1—2008, статья 3.3.1]

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

КМАФАнМ — количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов;

КОЕ — колониеобразующая единица;

БГКП — бактерии группы кишечных палочек.

4 Общие положения

4.1 Общие требования проведения микробиологического анализа — по ГОСТ Р ИСО 7218.

4.2 Требования безопасности

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

Требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

4.3 Требования к персоналу — по ГОСТ Р ИСО 7218.

5 Средства измерений, аппаратура, материалы, реактивы и культуральные среды

Автоклав по ГОСТ Р ИСО 7218.

Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 200 г (для взвешивания реактивов), с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,01 мг.

Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 1 кг (для взвешивания продукта), с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 20 мг.

Дозатор питательных сред и реактивов по ГОСТ Р ИСО 7218.

Гомогенизатор по ГОСТ Р ИСО 7218.

Колбы по ГОСТ 25336.

Кружка по ГОСТ 9147.

Ламинарный шкаф II класса биологической безопасности.

Лампы бактерицидные ДБ-30 или ДБ-60 (1,5 — 2,5 Вт на 1 м воздуха).

Лупа по ГОСТ 25706.

Магнитные мешалки с подогревом до 300 °С.

Мензурки по ГОСТ 1770.

Микроскоп оптический по ГОСТ Р ИСО 7218.

Посуда одноразового использования для микробиологических исследований по ГОСТ Р ИСО 7218.

Петля бактериологическая.

Пинцеты по ГОСТ 21241.

Пипетки по ГОСТ 29228.

Пипетки пастеровские.

Поплавки (трубки Дархема).

Посудомоечная лабораторная машина по ГОСТ Р ИСО 7218.

Прибор для подсчета колоний по ГОСТ Р ИСО 7218.

Пробирки по ГОСТ 25336.

Пробки силиконовые, резиновые.

pH-метр с точностью калибровки ± 0,1 pH при температуре от 20 °С до 25 °С по ГОСТ Р ИСО 7218.

Печь микроволновая для расплавления питательных сред по ГОСТ Р ИСО 7218.

Скальпели и ножи медицинские по ГОСТ 21240.

Спиртовка по ГОСТ 25336.

Стаканы по ГОСТ 25336.

Стекла предметные по ГОСТ 9284.

Стекла покровные по ГОСТ 6672.

Стерилизационный сушильный шкаф для температурного режима (180 ± 0,5) °С по ГОСТ Р ИСО 7218.

Ступка по ГОСТ 9147.

Термометры жидкостные стеклянные с диапазоном температуры от 0 °С до 50 °С и от 50 °С до 100 °С по ГОСТ 28498.

Термостаты электрические для выращивания микроорганизмов с автоматическим терморегулятором, обеспечивающие поддержание температуры от 20 °С до 55 °С по ГОСТ Р ИСО 7218.

Упаковочный материал для стерилизации и хранения стерильного материала, посуды [3].

Флаконы из темного стекла с притертой пробкой.

Холодильник или холодильная камера по ГОСТ Р ИСО 7218.

Цилиндр по ГОСТ 1770.

Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

Чашки Петри стеклянные по ГОСТ 25336.

Бумага крепированная [3].
Бумага оберточная по ГОСТ 8273.
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.
Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.
Агар микробиологический по ГОСТ 17206.
Агар сухой питательный.
Бриллиантовый зеленый.
Бромтимоловый синий.
Вода дистиллированная по ГОСТ Р ИСО 11133-1.
Вода питьевая по ГОСТ Р 51232.
Генциан фиолетовый.
Глицерин, х. ч., по ГОСТ 6824.
Глюкоза, х. ч. или ч. д. а., по ГОСТ 6038.
Дрожжевой диализат.
Дрожжевой экстракт по 6.3.27.
Дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 171.
Железо (III) аммония сульфат (соль Мора) по ГОСТ 4208.
Железо сернокислое по ГОСТ 4148.
Желчь крупного рогатого скота натуральная или сухая по 6.3.23.
Индикатор Андреде по ГОСТ 10444.1.
Йод кристаллический по ГОСТ 4159.
Кристаллический фиолетовый.
Калия гидрат окиси технический по ГОСТ 9285.
Калий йодистый (йодид) по ГОСТ 4232.
Калий фосфорнокислый двузамещенный (3-водный) по ГОСТ 2493.
Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.
Кальций углекислый по ГОСТ 4530.
Кислота карболовая кристаллическая (фенол).
Кислота розоловая, ч. д. а.
Кислота соляная по ГОСТ 3118.
Кислота щавелевая по ГОСТ 22180.
Лактоза.
Люголя раствор (для окраски мазков по Граму) по ГОСТ 10444.1.
Магний сернокислый по ГОСТ 4523.
Магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4209.
Мальтоза.
Маннит.
Мел химически осажденный по ГОСТ 8253.
Метиленовый синий (голубой).
Метиловый красный.
Метиловый фиолетовый.
Мочевина.
Мясо — говядина (охлажденное) по ГОСТ 779.
Натрий-аммоний фосфорнокислый по ГОСТ 4170.
Натр едкий очищенный по ГОСТ 11078.
Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201.
Натрий лимоннокислый по ГОСТ 22280.
Натрий селенистокислый (гидроселенит).
Натрий сернокислый по ГОСТ 4166.
Натрий серноватистокислый по ГОСТ 27068.
Натрий углекислый по ГОСТ 83.
Натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 4172.
Натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245.
Натрий хлористый по ГОСТ 4233.
Парадиметиламидобензальдегид.
Пептон сухой ферментированный бактериологический по ГОСТ 13805.
Водорода пероксид по ГОСТ 10929.
Печень говяжья, свиная по ГОСТ 19342.

Плазма кроличья сухая цитратная по ГОСТ Р 52815.
Сахароза по ГОСТ 5833.
Свинец (II) уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 1027.
Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.
Фуксин кислый.
Феноловый красный.
Фуксин основной.
Хлороформ по ГОСТ 20015.
Эфир этиловый.
Яйца куриные по ГОСТ Р 52121.
Агар желточно-солевой по 6.3.29.
Агар висмут-сульфитный.
Агар Левина.
Агар Клиглера.
Агар мясо-пептонный по ГОСТ 10444.1.
Агар мясо-пептонный полужидкий по ГОСТ Р 52814.
Бульон желточно-солевой.
Бульон мясо-пептонный по ГОСТ 10444.1.
Бульон солевой по 6.3.28.
Диагностикум латексный для серотипирования бактерий рода Salmonella [4].
Изотонический раствор хлористого натрия.
Пептонно-буферная среда по ГОСТ Р 50396.0.
Среда Гисса по ГОСТ 10444.1.
Среда Плоскирева.
Среда Кесслера по ГОСТ Р 52816.
Среда Кауфмана по 6.3.22.
Среда селенитовая по ГОСТ Р 52814.
Селенит-цистиновый накопительный бульон по ГОСТ Р 52814.
Среда магниевая (хлористо-магниевая) по 6.3.25.
Среда Ресселя по 6.3.21.
Среда с маннитом или мальтозой.
Среда Крумвиде-Олькеницкого (трехсахарный агар с мочевиной) по 6.3.26.
Среда Хейфеца с лактозой по 6.3.19.
Среда Лейфсона по 6.3.24.
Среда Эндо.
Сухой ГРМ-агар по ГОСТ Р 52816.
Сухой мясо-пептонный бульон.
Сыворотки сальмонеллезные О- и Н-агглютинирующие адсорбированные, поливалентные и моноцепторные.
Реактив Эрлиха по ГОСТ Р 52814.
Тест-полоски для определения аминопептидазы по [4].

5.1 Подготовка посуды и материалов — по ГОСТ Р ИСО 7218.

5.2 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов, реактивов по качеству не ниже указанных.

5.3 Допускается использование других готовых и сухих (дегидратированных) культуральных сред отечественного и зарубежного производства, предназначенных для указанных целей.

6 Подготовка к проведению анализов

6.1 Отбор и подготовка проб

Отбор и подготовку проб к анализу проводят по ГОСТ Р 53669 со следующими дополнениями:

- проба для проведения анализа должна быть представительной, не поврежденной и не измененной в процессе транспортирования и временного хранения;
- для проведения микробиологического анализа из объединенной пробы отбирают 100 $см^3$ (г) продукта.

6.2 Приготовление разведений

Для приготовления исходного разведения в колбу вместимостью 250 см^3 вносят 10 см^3 (г) продукта, отобранного из объединенной пробы, добавляют 90 см^3 стерильной питьевой воды или стерильного изотонического раствора хлористого натрия, или другого разбавителя по ГОСТ 26669. Смесь взбалтывают. Получают исходное разведение (1:10).

Приготовление разведений проводят по ГОСТ 26669 со следующими дополнениями:

- последующие разведения готовят до 1:10 000 для жидких и до 1:1 000 для сухих продуктов;
- при приготовлении разведений соблюдают условия, исключающие вторичное микробное загрязнение;
- время с момента окончания приготовления последнего разведения до начала высева не должно превышать 20 мин.

6.3 Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и культуральных сред

6.3.1 Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред, сроки и условия их хранения — по ГОСТ Р ИСО 11133-1, [6].

6.3.2 Приготовление растворов индикаторов — по ГОСТ 4919.1.

6.3.3 Раствор Люголя (для среды Кауфмана)

25 г йодида калия растворяют в 5—10 см^3 дистиллированной воды, прибавляют 20 г кристаллического йода, оставляют на несколько часов до полного его растворения, затем доводят объем раствора дистиллированной водой до 100 см^3.

6.3.4 Раствор серноватистокислого натрия (тиосульфата, гипосульфита)

50 г химически чистого кристаллического серноватистокислого натрия (тиосульфата, гипосульфата) растворяют в 5—10 см^3 дистиллированной воды, затем доводят объем раствора дистиллированной водой до 100 см^3 и стерилизуют кипячением в течение 30 мин.

6.3.5 Изотонический раствор хлористого натрия

8,5 г хлористого (хлорида) натрия растворяют в 1 дм^3 дистиллированной воды. Раствор доводят до кипения, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

6.3.6 Реактив Эрлиха

В 50 см^3 этилового спирта с массовой долей 96 % растворяют 4 г парадиметиламидобензальдегида, затем медленно добавляют 50 см^3 концентрированной соляной кислоты. Реактив хранят во флаконе из темного стекла с притертой пробкой при температуре 4 °С—8 °С.

6.3.7 Раствор розоловой кислоты массовой долей 5 %

0,5 г порошка розоловой кислоты всыпают во флакон из темного стекла с притертой пробкой и заливают 10 см^3 этилового ректификованного спирта с массовой долей 96 %. Через 24 ч раствор готов к употреблению, раствор допускается использовать в течение месяца.

6.3.8 Водный раствор метиленового синего (голубого) массовой долей 0,1 %

0,1 г метиленового синего (голубого) всыпают во флакон из темного стекла с притертой пробкой и заливают 100 см^3 дистиллированной воды, ставят на сутки в термостат при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

6.3.9 Индикатор бромтимоловый синий

0,4 г бромтимолового синего растворяют в 40 см^3 дистиллированной воды, нагревая ее до кипения. После этого к раствору прибавляют 6,4 см^3 раствора гидрата окиси натрия молярной концентрации 0,1 моль/дм^3, в результате чего жидкость приобретает зеленоватый цвет, и доводят дистиллированной водой до 100 см^3.

Индикатор следует хранить в склянке с притертой пробкой в темном месте.

6.3.10 Раствор фенолового красного массовой долей 1,6 %

В 100 см^3 стерильной дистиллированной воды растворяют 1,6 г фенолового красного.

6.3.11 Водный раствор бриллиантового зеленого в соотношении 1:1000

1 г бриллиантового зеленого растворяют в 100 см^3 этилового ректификованного спирта с массовой долей 96 % и настаивают в течение 24 ч. 10 см^3 полученного 1 %-ного спиртового раствора доливают до 100 см^3 дистиллированной воды, тщательно взбалтывают.

6.3.12 Карболовый раствор кристаллического фиолетового или генциан фиолетового

1 г кристаллического фиолетового или генциан фиолетового растирают в фарфоровой ступке с 2 г кристаллической карболовой кислоты (фенола). Во время растирания небольшими порциями приливают 10 см^3 этилового спирта с массовой долей 96 %. Раствор фильтруют через влажный бумажный фильтр.

Растворы генциан фиолетового или кристаллического фиолетового нестойки, их готовят перед употреблением.

6.3.13 Карболовый раствор фуксина Циля

1 г порошка основного фуксина растирают в ступке с 5 г кристаллической карболовой кислоты и 0,5 см^3 (несколько капель) глицерина. Во время растирания небольшими порциями прибавляют 10 см^3 этилового спирта с массовой долей 96 %. После полного растирания к смеси прибавляют при постоянном помешивании 100 см^3 дистиллированной воды и выдерживают 2 сут, после чего фильтруют.

Фуксин Циля хранят во флаконе из темного стекла с притертой пробкой.

6.3.14 Спиртоводный раствор фуксина Пфейфера

К одной части карболового раствора фуксина Циля приливают девять частей дистиллированной воды. Раствор нестойкий, его готовят перед использованием.

6.3.15 Бумага индикаторная для обнаружения индола

Листы фильтровальной бумаги обильно смачивают горячим насыщенным 12 %-ным раствором щавелевой кислоты, высушивают при температуре (23 ± 2) °С, затем нарезают полосками шириной 0,2—0,4 мм, длиной 5—6 см и хранят во флаконе из темного стекла с притертой пробкой.

6.3.16 Красящие бумажки с кристаллическим фиолетовым или генциан фиолетовым для окраски по Граму в модификации Синева

1 г кристаллического фиолетового или генциан фиолетового, 100 см^3 этилового спирта с массовой долей 96 % и 5 см^3 глицерина смешивают, наливают в лоток или глубокую тарелку.

Фильтровальную бумагу нарезают в виде полосок шириной 2,0—2,5 см и длиной 30—50 см. Полоску погружают на несколько секунд в краситель так, чтобы смачивались обе ее поверхности. Окрашенные полоски вынимают пинцетом, дают красителю стечь и подвешивают для высушивания. Бумагу сушат в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Высушенные полоски бумаги разрезают на кусочки размером 2 × 2 или 2 × 4,5 см.

6.3.17 Мясная вода

Охлажденную говядину освобождают от костей, сухожилий, жира, измельчают. 1 кг полученного фарша заливают двух- или четырехкратным количеством питьевой воды (по массе), нагревают и кипятят в течение полутора часов, постоянно помешивая и удаляя накипь. После кипячения мясную воду остужают, удаляют жир. Жидкость фильтруют через вату или полотно, потом через фильтровальную бумагу до полной прозрачности. Фильтрат измеряют и доводят до первоначального объема кипяченой питьевой водой, затем разливают по бутылям и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 30 мин.

6.3.18 Пептонная вода

К 1 дм^3 дистиллированной воды прибавляют 10 г пептона и 5 г хлористого натрия, устанавливают pH (7,4 ± 0,2), кипятят таким образом, чтобы после кипячения он находился в ранее установленных пределах, фильтруют через бумажный фильтр до полной прозрачности и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 30 мин.

6.3.19 Среда Хейфеца с лактозой

В колбу вместимостью 1 дм^3 вносят 10 г пептона, 5 г лактозы, 5 г хлористого натрия и индикаторы: 1 см^3 5 %-ного спиртового раствора розоловой кислоты и 2,5 см^3 0,1 %-ного водного раствора метиленового синего (голубого), заливают 1 дм^3 питьевой воды и нагревают до кипения.

Устанавливают pH 7,4—7,6. Среду разливают по 10 см^3 в стерильные пробирки с поплавками (трубки Дархема).

Стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 20 мин.

6.3.20 Среда с углеводом (маннитом или мальтозой) и феноловым красным

К 1 дм^3 стерильного питательного агара добавляют 52 см^3 1,6 %-ного водного раствора фенолового красного и 10 г углеводов (маннита или мальтозы). Предварительно углеводы растворяют в небольшом объеме стерильной дистиллированной воды.

К расплавленному и охлажденному до (80 ± 2) °С стерильному питательному агару добавляют углеводы (маннит или мальтозу) и индикатор феноловый красный, смесь перемешивают, при необходимости еще раз расплавляют готовую среду, разливают в стерильные чашки Петри и подсушивают. Среда пурпурно-красного цвета. Среду готовят с соблюдением стерильности.

6.3.21 Среда Ресселя

К 1 дм^3 2,0 %-ного питательного или мясо-пептонного агара (pH 7,2) прибавляют 10 г лактозы, 1 г глюкозы и 10 см^3 индикатора Андреде.

Среду разливают в пробирки в количестве 5—6 см^3, стерилизуют в автоклаве при (112 ± 1) °С в течение 20 мин и скашивают так, чтобы на 2—3 см от дна пробирки агар оставался в виде столбика.

Готовая среда бледно-розового цвета.

6.3.22 Среда Кауфмана

Колбу, содержащую 4,5 г мела, стерилизуют сухим жаром, наливают в нее 90 см^3 мясо-пептонного бульона и стерилизуют при (121 ± 1) °С 30 мин.

Перед посевом в асептических условиях в колбу добавляют 2 см^3 раствора Люголя (см. 6.3.1), 10 см^3 50 %-ного раствора серноватистокислого натрия (тиосульфата), 5 см^3 стерильной желчи и 1 см^3 водного раствора бриллиантового зеленого в соотношении 1:1 000. Смесь тщательно взбалтывают.

6.3.23 Желчь

Отобранную асептически желчь крупного рогатого скота прогревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. После отстаивания фильтруют и разливают по колбам, стерилизуют текучим паром три дня подряд по 20 мин или однократно в автоклаве при температуре (112 ± 1) °С.

Можно использовать сухую желчь, при этом 1 г сухой желчи соответствует 10 см^3 натуральной желчи.

6.3.24 Селенитовая среда Лейфсона

Для приготовления среды готовят два раствора: А и Б.

Раствор А состоит из 5 г пептона, 7 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия, 3 г однозамещенного фосфорнокислого натрия, 4 г химически чистой лактозы, 1 дм^3 дистиллированной воды, pH (7,0 ± 0,1). Компоненты смешивают, разливают в стерильную посуду по 225 см^3 и стерилизуют текучим паром по 30 мин или при (112 ± 1) °С в течение 30 мин.

В раствор Б входит 10 %-ный раствор кислого селенистокислого натрия, приготовленного на стерильной дистиллированной воде (готовят перед употреблением).

Перед началом работы к 225 см^3 раствора А стерильно добавляют 9 см^3 раствора Б.

6.3.25 Магниевая (хлористо-магниевая) среда

Среда состоит из трех растворов.

Раствор I: пептон — 4,2 г, натрия хлорид — 7,15 г, калия дигидрофосфат — 1,48 г, дрожжевой диализат — 9 см^3, вода дистиллированная — 890 см^3.

Раствор II: магния хлорид — 35,7 г, вода дистиллированная — 90 см^3.

Раствор III: бриллиантовый зеленый 0,5 %-ный, водный раствор — 0,9 см^3.

Все три приготовленных раствора смешивают, разливают в колбы, флаконы, пробирки. Стерилизуют при (112 ± 1) °С 30 мин.

При отсутствии дрожжевого диализата допускается замена его дрожжевым экстрактом.

6.3.26 Среда Крумвиде-Олькеницкого (трехсахарный агар с мочевиной)

Агар питательный сухой — 25 г, лактоза — 10 г, сахароза — 10 г, глюкоза — 1 г, железо (III) аммоний сульфат (соль Мора) — 0,2 г, натрия тиосульфат (гипосульфит, серноватистокислый натрий) — 0,3 г, мочевина — 10 г, феноловый красный 0,4 %-ный водный раствор — 4 см^3, вода дистиллированная — 1 дм^3.

Соли предварительно растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды. Углеводы и мочевину также растворяют в небольших объемах воды при подогревании на водяной бане. Сухой питательный агар расплавляют в оставшемся объеме воды при нагревании и помешивании. Затем все ингредиенты соединяют, перемешивают с расплавленным агаром, фильтруют через марлевый фильтр, устанавливают pH (7,3 ± 0,1), добавляют индикатор и разливают в стеклянные пробирки по 6—7 см^3.

Среду стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 20 мин, скашивают, оставляя столбик 2,0—2,5 см. Готовая среда бледно-розового цвета. Среду хранят при комнатной температуре не более 7 сут.

6.3.27 Дрожжевой экстракт

100 г измельченных хлебопекарных прессованных дрожжей заливают 1 дм^3 дистиллированной воды, кипятят при постоянном перемешивании до тех пор, пока не сойдет пена, и помещают на 24 ч при (5 ± 1) °С в холодильник. Затем эмульсию фильтруют через вату и фильтрат стерилизуют 20 мин при (121 ± 1) °С.

5 см^3 жидкого дрожжевого экстракта равноценны 1 г дрожжевого экстракта в порошке.

6.3.28 Солевой бульон

1 дм^3 мясо-пептонного бульона и 6,5 г хлористого натрия смешивают в колбе вместимостью 2 дм^3, разливают в пробирки по 10 см^3. Стерилизуют (20 ± 1) мин в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С. Хранят не более 28 сут при температуре (4 ± 1) °С.

6.3.29 Желточно-солевой агар

К 1 дм^3 солевого бульона по 6.3.31 добавляют 20 г питательного агара, расплавляют на водяной бане, при необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают мерным цилиндром по 100 см^3 в колбы вместимостью 250 см^3 и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 30 мин. Получают солевой агар. Вместо солевого бульона можно использовать как основу сухой питательный агар, мясо-пептонный бульон, бульон Хоттингера, добавляя 65 г хлористого натрия.

Для приготовления желточной эмульсии на дно стерильной чашки Петри помещают куриное яйцо, тщательно протирают его ватой, смоченной этиловым спиртом, и обжигают. Стерильным пинцетом про-

бивают с двух противоположных сторон яйца два отверстия, через одно из этих отверстий из яйца полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу вместимостью 200 $см^3$. К желтку постепенно добавляют (частями по 20—30 $см^3$) 200 $см^3$ стерильного изотонического раствора, содержимое тщательно встряхивают (гомогенизируют) до получения гомогенной массы.

Для приготовления желточно-солевого агара на 1 $дм^3$ стерильного расплавленного и остуженного до (45 ± 1) °С солевого агара добавляют 200 $см^3$ желточной эмульсии, после полного размешивания желточно-солевой агар разливают в стерильные чашки Петри по 20—25 $см^3$ и хранят в холодильнике до 5—7 сут.

6.4 Приготовленные растворы реактивов, если в техническом документе не установлено иначе, хранят во флаконах из темного стекла с притертой пробкой в холодильнике при температуре 4 °С—8 °С не более 3 мес или при температуре 18 °С—23 °С — не более 1 мес.

6.5 Приготовление мазков и окраска по методу Грама по ГОСТ Р ИСО 7218. Допускается проводить окраску мазков модифицированным методом по Граму (без фенола) по [7], а также с использованием тест-полосок для определения аминопептидазы (экспресс-метод определения грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов) по [4].

7 Метод выявления и определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

7.1 Сущность метода

Метод основан на высеве определенного количества продукта в плотные культуральные среды, аэробном культивировании посевов при температуре (30 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч, подсчете всех выросших видимых колоний и определении количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 $см^3$ (г) продукта.

7.2 Проведение анализа

Из навески подготовленной пробы продукта (см. 6.1) готовят исходное и ряд 10-кратных разведений (см. 6.2) до такой степени, чтобы можно было определить предполагаемое количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 $см^3$ (г) яичного продукта.

Посевы проводят глубинным агаровым методом. Перед посевом чашки маркируют. На дне чашки Петри маркером ставят номер исследуемого образца продукта, разведение и дату. Высевают одновременно в две чашки Петри (параллельные определения) по 1 $см^3$ соответствующих последовательных разведений. Пипетку с посевным материалом держат под углом 45°, не касаясь концом пипетки дна чашки.

В каждую чашку Петри с посевным материалом не позднее чем через 15 мин добавляют (18 ± 2) $см^3$ одной из агаризованных расплавленных и охлажденных до температуры (45 ± 1) °С культуральных сред (питательного, мясо-пептонного агара, ГРМ-агара или др.). Чашки с посевами, залитыми питательной средой, осторожно покачивают или вращают для равномерного распределения посевного материала во всей питательной среде.

Чашки Петри с посевами расставляют на горизонтальной поверхности до полного застывания культуральной среды.

Для предотвращения роста микроорганизмов, образующих налеты на поверхности среды (ползучий рост), в чашки Петри с посевным материалом наливают (13 ± 2) $см^3$ выбранной культуральной среды, перемешивают и после застывания на нее наливают без перемешивания второй слой — (5 ± 2) $см^3$ этой же разогретой и охлажденной до температуры (45 ± 1) °С культуральной среды.

После застывания среды чашки с посевами, перевернутые дном вверх, культивируют в термостате при температуре (30 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч. Допускается предварительный учет количества выросших колоний через (48 ± 1) ч с последующим окончательным учетом еще через (24 ± 1) ч. Чашки Петри с посевами распределяют в термостате по ГОСТ Р ИСО 7218.

7.3 Обработка результатов

7.3.1 Результаты анализа оценивают по каждой пробе отдельно.

Подсчет микроорганизмов проводят по ГОСТ Р ИСО 7218. Подсчет проводят в посевах того разведения, количество колоний в котором не более 300.

Для получения достоверных результатов при подсчете количества колоний необходимо, чтобы хотя бы в одной чашке содержалось не менее 15 колоний.

7.3.2 Количество микроорганизмов N в 1 см^3 (г) продукта вычисляют как средневзвешенное значение из подсчетов двух последовательных разведений по формуле

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0{,}1n_2)d}, \quad (1)$$

где ΣC — сумма колоний, подсчитанных на всех чашках в двух последовательных разведениях, из которых хотя бы в одной из них содержалось не менее 15 колоний;

V — объем посевного материала, внесенного в чашку, см^3;

n_1 — количество отобранных для подсчета чашек первого выбранного разведения;

n_2 — количество отобранных для подсчета чашек последующего разведения;

d — коэффициент разбавления, соответствующий первому выбранному разведению.

Пример

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0{,}1\,n_2)\,d} = \frac{210 + 172 + 26 + 29}{1\,(2 + 0{,}1 \cdot 2)\,10^{-3}} = \frac{437}{0{,}0022} = 198636 = 1{,}9 \cdot 10^5.$$

Результаты вычисления округляют. Для этого, если последняя цифра меньше пяти, предшествующую цифру не изменяют; если последняя цифра равна или больше пяти, предшествующую цифру увеличивают на единицу. Округление проводят поэтапно, до двух значащих цифр.

Результаты подсчета количества микроорганизмов в 1 см^3 (г) продукта выражают числом КОЕ от 1,0 до 9,9, умноженным на 10 в соответствующей степени, и записывают следующим образом: КМАФАнМ: Nx10^n КОЕ/ в 1 см^3 (г).

Если в чашках на уровне исходной пробы продукта не содержится ни одной колонии, то результат выражают: меньше чем 1,0 × 10 микроорганизмов в 1 см^3 (г) продукта и записывают как КМАФАнМ: < 10 КОЕ/см^3 (г).

7.3.3 Допускается для целей экспрессного выявления и определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов использовать следующее: подложки или пластины в виде подготовленной тест-системы, содержащей набор питательных веществ; бактериологические анализаторы, основанные на оптико-электронном принципе, и другие методы, зарегистрированные и разрешенные к применению в Российской Федерации. Проведение анализа и учет результатов с использованием таких методов проводят по методическим инструкциям, утвержденным в установленном порядке.

8 Метод выявления бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

8.1 Сущность метода

Метод основан на выявлении бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий), способных ферментировать лактозу с образованием кислоты и газа.

8.2 Проведение анализа

По 1 см^3 из разведений жидких или сухих яичных продуктов, приготовленных по 6.1.2, вносят в пробирки со средой Кесслера или Хейфеца. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч. Из пробирок с признаками роста (изменение цвета среды, помутнение, газообразование) делают высев на среду Эндо. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч. Затем посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий группы кишечных палочек (плоские или слегка выпуклые, или с валиком, красные с различной интенсивностью окраски, розовые, бледно-розовые с металлическим или без металлического блеска). Из не менее чем трех характерных колоний готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют.

8.3 Обработка результатов

8.3.1 Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

Обнаружение на среде Эндо характерного роста колоний, наличие в мазках из этих колоний грамотрицательных палочек, сбраживающих лактозу с образованием кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С, указывают на выявление в продукте бактерий группы кишечных палочек.

Результат записывают как: БГКП «не обнаружены» или «обнаружены» в 0,1 см^3 (г) продукта.

8.3.2 Допускается для целей экспрессного выявления и определения бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) использовать следующее: подложки или пластины в виде подготовленной системы, содержащей набор питательных веществ, герметично закрытых непроницаемой

мембраной; бактериологические анализаторы, основанные на оптико-электронном принципе и на принципе импеданса.

Проведение анализа и учет результатов с использованием таких методов проводят по инструкциям к прибору.

9 Метод выявления бактерий рода Salmonella

9.1 Сущность метода

Метод основан на использовании сред обогащения с последующим выделением сальмонелл на дифференциально-диагностических средах, а также на изучении культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств культур.

9.2 Проведение анализа

25 $см^3$ (г) продукта из средней пробы, с соблюдением стерильности, вносят в колбу, содержащую 225 $см^3$ одной из сред обогащения (Кауфмана, магниевой, селенитовой или селенит-цистиновой накопительной), встряхивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 16—20 ч. Затем проводят высев бактериологической петлей (диаметр 0,4—0,5 мм) из сред обогащения в чашки Петри с висмут-сульфитным агаром или средой Плоскирева, или агаром Левина.

Чашки Петри с посевом инкубируют при температуре (37 ± 1) °С. Учет результатов проводят на висмут-сульфитном агаре через 48 ч, на среде Плоскирева и Левина — через 18—24 ч.

Сальмонеллы на висмут-сульфитном агаре образуют черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией и нежные светло-зеленые колонии.

На средах Плоскирева и Эндо колонии сальмонелл прозрачные, на среде Левина — голубоватые.

При отсутствии типичных или предположительно относящихся к бактериям рода Salmonella колоний или при наличии слабого роста микробов на плотных дифференциальных средах чашки с посевами повторно инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 20—24 ч.

Затем снова определяют присутствие колоний сальмонелл. При обнаружении подозрительных на сальмонеллы колоний продолжают исследование. В противном случае работу с посевами прекращают. При наличии типичных, характерных для сальмонелл колоний, из них берут не менее трех колоний. Если имеется на одной чашке менее трех типичных колоний, то берут все выросшие подозрительные на сальмонеллы колонии для пересева в пробирки: со скошенным питательным или мясо-пептонным агаром, с мясо-пептонным бульоном, с пептонной водой и на одну из дифференциальных сред Ресселя, Крумвиде-Олькеницкого, Клиглера.

Среды Ресселя, Крумвиде-Олькеницкого, Клиглера засевают сначала штрихом на скошенную поверхность, а затем уколом в глубину столбика.

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

Выросшие культуры с поверхности скошенного агара используют для постановки реакции агглютинации и приготовления мазков. Мазки окрашивают по Граму и микроскопируют.

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

Посевы на мясо-пептонном бульоне и пептонной воде используют для определения способности выделенных культур образовывать сероводород и индол.

Подтверждение наличия сальмонелл в продукте дает рост на средах Ресселя, Крумвиде-Олькеницкого, Клиглера.

На средах Ресселя, Крумвиде-Олькеницкого, Клиглера оценивают окраску и газообразование. При росте сальмонелл в средах Ресселя, Крумвиде-Олькеницкого, Клиглера в малиновый цвет окрашивается столбик (за счет расщепления глюкозы), скошенная часть среды остается бледно-розовой при отсутствии расщепления лактозы, сахарозы или обоих сахаров. Газообразование устанавливают по трещинам и разрывам столбиков агара. На средах Крумвиде-Олькеницкого, Клиглера образование сероводорода обнаруживают на основании почернения среды (от темной линии по месту протокола среды до разлитого почернения всего столбика). Расщепление мочевины выявляется по восстановлению первоначального цвета (бледно-розового) столбика среды.

Сальмонеллы мочевину не разлагают, сероводород образуют.

При необходимости более полной биохимической характеристики культуры пересеивают на цветные среды Гисса с углеводами («короткий пестный ряд» с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом и мальтозой) и определяют их способность образовывать индол и сероводород.

С этой целью суточную культуру, взятую со скошенного питательного или мясо-пептонного агара, растирают в 1,0 $см^3$ физиологического раствора. Затем по две капли (0,2 $см^3$) взвеси вносят пастеровской пипеткой в среды Гисса, пептонную воду или мясо-пептонный бульон. Культуральные среды с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1) °С.

На средах Гисса через 24 ч термостатирования учитывают кислотообразование (среды приобретают розово-красный цвет) и газообразование (наличие пузырьков в поплавках).

Для обнаружения индола в пробирку с мясо-пептонным бульоном или пептонной водой сразу же после посева испытуемой культуры помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную насыщенным водным раствором щавелевой кислоты. Бумажку помещают таким образом, чтобы она удерживалась пробкой, но не прикасалась к среде. При наличии индола через 1—3 дня инкубирования при температуре (37 ± 1) °С нижняя часть бумажки окрашивается в розовый цвет, хорошо заметный в проходящем свете. Индол можно определить и другим способом: в пробирку с суточной бульонной культурой осторожно по стенке добавляют 5—10 капель реактива Эрлиха. Перед добавлением реактива к бульону можно ввести 2 $см^3$ этилового эфира. При наличии индола не позднее чем через 5 мин в пограничном слое образуется ярко-красное кольцо. Сальмонеллы индола не образуют.

9.3 Для биохимической идентификации бактерий рода Salmonella допускается использование экспресс тест-систем, которые представляют собой набор одноразового использования в виде планшета со стрипами, на дно лунок которых нанесены соответствующие субстраты с индикаторами. Проведение анализа и учет результатов проводят по инструкции производителя.

9.4 Для подтверждения принадлежности выделенных культур к бактериям рода сальмонелл проводят серологическую идентификацию с помощью реакции агглютинации.

9.4.1 Проведение реакции агглютинации

На предметное стекло помещают каплю изотонического раствора хлористого натрия и рядом каплю поливалентной агглютинирующей сальмонеллезной сыворотки.

В каждую из приготовленных капель, начиная с изотонического раствора хлористого натрия, вносят петлей часть анализируемой колонии, равномерно растирают и покачивают предметное стекло в течение 30—60 с. Стекло помещают на темный фон и через 0,5—2,0 мин просматривают с помощью лупы по ГОСТ 25706. Агглютинация проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости.

При отрицательной реакции агглютинации культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки образует гомогенную смесь.

9.5 Допускается проводить серотипирование бактерий рода Salmonella с использованием метода латексной агглютинации [8].

Метод используется в качестве дополнительного подтверждающего теста и основан на визуальном определении наличия конгломератов агглютинации, цвет которых соответствует конкретной серологической группе сальмонелл.

Проведение анализа и учет результатов проводят по инструкции производителя.

9.6 Обработка результатов

9.6.1 Результаты исследований оценивают по каждой пробе отдельно.

Интерпретацию результатов анализа выявленных культур проводят по ГОСТ Р ИСО 7218.

Культуры, предположительно отнесенные к бактериям рода Salmonella, для окончательной идентификации исследуют по ГОСТ Р ИСО 7218. В этом случае результаты выявления бактерий рода Salmonella выдают после получения ответа по окончательной идентификации.

Результаты анализа записывают следующим образом: бактерии рода Salmonella «обнаружены» или «не обнаружены» в 25 $см^3$ (г) продукта.

9.6.2 Допускается для целей экспрессного выявления бактерий рода Salmonella и/или подтверждения принадлежности выделенных культур к бактериям рода Salmonella применять методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) по ГОСТ Р 52833; иммуноферментного анализа (экспресс-тесты для выявления бактерий рода Salmonella); гибридизационного ДНК-РНК анализа; твердофазного иммуноферментного анализа; использовать бактериологические анализаторы, основанные на принципе импеданса.

10 Метод выявления бактерий рода Proteus

10.1 Сущность метода

Метод основан на высеве определенного количества продукта в конденсационную воду свежескошенного агара, способности бактерий рода Proteus давать ползучий, опережающий другие виды бактерий рост и образовывать сероводород.

10.2 Проведение анализа

1 $см^3$ жидких продуктов или 1 $см^3$ из разведений 1:10 прочих продуктов вносят в конденсационную воду пробирок со свежескошенным питательным или мясо-пептонным агаром, не прикасаясь к скошенной поверхности среды. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч.

При учете посевов обращают внимание на образование ползучего муарообразного налета с голубоватым оттенком на скошенном агаре, поднимающегося из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды и издающего резкий гнилостный запах. При появлении характерного роста микробов рода Proteus готовят мазки, окрашивают их по Граму, микроскопируют. Бактерии рода Proteus — неспорообразующие грамотрицательные палочки.

Для определения способности образовывать сероводород подозрительные на сальмонеллы культуры с агара высевают методом укола в столбик и штрихами по скошенной поверхности одной из сред — Крумвиде-Олькеницкого или Клиглера. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч. При образовании сероводорода столбик среды чернеет. Бактерии рода Proteus образуют сероводород, при этом в столбике среды появляется газ, что указывает на ферментацию глюкозы.

10.3 Определение количества бактерий рода Proteus методом наиболее вероятного числа проводят по ГОСТ Р ИСО 7218, ГОСТ Р 52815.

10.4 Обработка результатов

10.4.1 Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

Наличие характерного роста в виде тонкого муарообразного налета, поднимающегося вверх от конденсата на свежескошенном агаре, резкого гнилостного запаха, неспорообразующих грамотрицательных палочек в мазках, образующих сероводород, указывает на присутствие бактерий рода Proteus в 1 $см^3$ (г) продукта.

Результат записывают как «не обнаружены» или «обнаружены» бактерии рода Proteus в 1 $см^3$ (г) продукта.

10.4.2 Для экспресс-выявления бактерий рода Proteus допускается использование биохимических тест-систем, допущенных к применению в Российской Федерации, которые представляют собой набор одноразового использования в виде планшета со стрипами, на дно лунок которых нанесены соответствующие субстраты с индикаторами. Проведение анализа и учет результатов проводят по инструкции производителя.

11 Метод выявления бактерий вида Staphylococcus aureus

11.1 Сущность метода

Метод основан на высеве определенного количества продукта или его разведений в культуральные селективные среды, способности стафилококков расти на средах с повышенным содержанием хлористого натрия, коагулировать плазму крови кролика и образовывать кислоту из маннита и мальтозы в аэробных условиях.

11.2 Проведение анализа

Продукты в количестве 1 $см^3$ (г) высевают в пробирки, содержащие по 9 $см^3$ солевого бульона. Через 24 ч инкубирования при температуре (37 ± 1) °С проводят пересев бактериологической петлей на чашки Петри с подсушенным желточно-солевым агаром. Чашки с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

Для лучшего выявления пигментов после суточной инкубации чашки с посевами выдерживают на свету при комнатной температуре 18—24 ч.

На желточно-солевом агаре колонии St. aureus имеют форму выпуклых дисков диаметром 2—4 мм желтого, белого, кремового, лимонного, золотистого цветов с ровными краями, вокруг колоний образуется радужное кольцо.

Из колоний, предположительно относящихся к St. aureus, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Колонии грамположительных мелких кокков, гроздевидно расположенные в мазке,

бактериологической петлей отсевают в чашки Петри с питательным или мясо-пептонным агаром. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

Из выросших на агаре колоний, предположительно относящихся к St. aureus, после проверки мазков на чистоту культуры под микроскопом ставят реакцию плазмокоагуляции. Для этого в две пробирки помещают по 0,5 $см^3$ разведенной кроличьей плазмы. В одну пробирку вносят петлей исследуемую суточную агаровую культуру, другую пробирку оставляют незасеянной. Пробирки помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С. Учет результатов проводят через 2—4 ч и пробирки оставляют до утра при комнатной температуре для окончательного учета. Пробирки следует просматривать осторожно, чтобы не разрушить образовавшийся сгусток.

При учете реакции плазмокоагуляции могут наблюдаться три степени активности фермента коагулазы:

++++ — сгусток плотный, при наклоне пробирки неподвижен;

+++ — сгусток, имеющий небольшой отсек, при наклоне пробирки подвижен, плотная коагуляция плазмы;

++ — сгусток в виде взвешенного мешочка, неполная коагуляция плазмы с образованием подвижного сгустка в центре плазмы.

Все три варианта являются положительным результатом. Колонии, предположительно относящиеся к St. aureus, выросшие на желточно-солевом агаре, бактериологической петлей пересевают в чашки Петри, содержащие агаризованную среду с маннитом (или мальтозой) и индикатором феноловым красным. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч. При положительной реакции вокруг колонии наблюдается желтое окрашивание среды, четко контрастирующее с пурпурно-красным фоном.

11.3 Для выявления и биохимической идентификации St. aureus допускается использование коммерческих тест-систем, допущенных к применению в Российской Федерации, которые представляют собой набор одноразового использования в виде планшета со стрипами, на дно лунок которых нанесены соответствующие субстраты с индикаторами. Проведение анализа и учет результатов проводят по инструкции производителя.

11.4 Обработка результатов

11.4.1 Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

Наличие грамположительных гроздевидно расположенных мелких кокков в мазках из характерных колоний на желточно-солевом агаре, положительная реакция плазмокоагуляции, ферментация маннита и мальтозы с образованием кислоты свидетельствуют о выявлении в 1 $см^3$ (г) продуктов St. aureus.

Результат записывают как «не обнаружены» или «обнаружены» St. aureus в 1 $см^3$ (г) продукта.

11.4.2 Допускается для целей экспрессного выявления St. aureus и/или подтверждения принадлежности выделенных культур к St. aureus использование подложек или пластин в виде подготовленной тест-системы, содержащей набор питательных веществ, герметично закрытых непроницаемой мембраной; иммунохроматографических экспресс-тестов; бактериологических анализаторов, например на принципе импеданса; метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) по ГОСТ Р 52833. Проведение анализа и учет результатов с использованием таких методов проводят по инструкциям к прибору.

Библиография

[1]	СП 1.2.036—95	Санитарные правила. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмами III—IV групп патогенности
[2]	СП 1.3.2322—2008	Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней
[3]	МУ 24-92—1992	Министерство медицинской промышленности. Контроль стерильности материалов первичной упаковки
[4]	МР № 24 ФЦ/730	Тест-полоски для определения аминопептидазы (экспресс-метод определения грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов)
[5]	МУ 2.1.4.1057—2001	Методические указания. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды
[6]	МУК 4.2.2316—2008	Методические указания. Методы контроля бактериологических питательных сред
[7]	МР № 24 ФЦ/730	Методические рекомендации. Модифицированная (без фенола) окраска по Граму
[8]	МР № 02.014—2006	Методические рекомендации. Серотипирование бактерий рода Salmonella методом латексной агглютинации. Утверждены главным врачом ФГУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора 08.12.2001

УДК 637.544:006.354 ОКС 67.120.20 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: пищевые продукты переработки яиц, мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, бактерии рода Salmonella, бактерии вида Staphylococcus aureus, бактерии рода Proteus, бактерии группы кишечных палочек (колиформные бактерии), классический метод, альтернативные методы, быстрые методы, хромогенные среды, флюорогенные среды, разведение пробы продукта, посев, инкубирование

Редактор *М.И. Максимова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Подписано в печать 25.10.2013. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,25. Тираж 39 экз. Зак. 1249.

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