ГОСТ Р 50455—92
(ИСО 3565—75)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Обнаружение сальмонелл (арбитражный метод)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.525.001.4:006.354 Группа Н19

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Обнаружение сальмонелл (арбитражный метод)

Meat and meat product. Detection of salmonellae (Reference method)

ГОСТ Р 50455—92

(ИСО 3565—75)

ОКС 07.100.30
ОКСТУ 9209

Дата введения 1994—01—01

1 Назначение

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения сальмонелл в мясе и мясных продуктах.

2 Область применения

Метод распространяется на все виды мяса и мясные продукты.

3 Ссылка

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

4 Определения

4.1 Сальмонеллы — микроорганизмы, образующие типичные колонии на плотных селективных питательных средах и имеющие биологические и серологические характеристики, описанные в настоящем стандарте.

4.2 Обнаружение сальмонелл — определение присутствия или отсутствия этих микроорганизмов в определенном продукте по методу, установленному настоящим стандартом.

5 Сущность метода

Обнаружение сальмонелл проходит в четыре стадии (см. пп. 5.1—5.4), так как они обычно присутствуют в небольших количествах, иногда в поврежденном состоянии, и часто в сопровождении большого количества других бактерий их группы.

5.1 Предварительное обогащение — выдерживание пробы в термостате в неселективной жидкой среде при температуре 37 °С.

5.2 Обогащение — посев предварительно обогащенной среды в две жидкие селективные среды с последующим выдерживанием в термостате при температуре соответственно 37 или 42—43 °С.

5.3 Посев на чашках — пересев двух обогащенных сред на плотные селективно-диагностические среды, которые, после выдерживания в термостате при температуре 37 °С, исследуют на наличие колоний, по своим характеристикам подозрительных на сальмонеллы.

5.4 Подтверждение — пересев подозрительных на сальмонеллы колоний и определение их биохимических и серологических характеристик.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

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

6 Питательные среды и реактивы

6.1 Основные материалы

Для получения сопоставительных результатов рекомендуется использовать безводные компоненты питательных сред одинакового качества, химические препараты аналитического качества или сухие готовые среды. Используемая вода должна быть дистиллированной или, по крайней мере, эквивалентной чистоты.

Примечание. Требования к бриллиантовому зеленому даны в приложении. Если используются сухие готовые среды, их следует готовить и применять в соответствии с рекомендацией поставщика.

6.2 Питательные среды

6.2.1 Буферная пептонная вода

Состав:

пептон	10,0 г
хлорид натрия	5,0 г
гидрофосфат натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	9,0 г
дигидрофосфат калия (KH_2PO_4)	1,5 г
вода	1000 см^3

Приготовление: растворяют все компоненты в кипящей воде, устанавливают pH так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,0±0,1) при 20 °С. Полученный раствор разливают по 225 см^3 в колбы вместимостью 500 см^3.

Стерилизуют среду в течение 20 мин при температуре (121±1) °С.

6.2.2 Среда тетратионатная (Мюллера-Кауфмана)

6.2.2.1 Основа

Состав:

мясной экстракт	5,0 г
пептон	10,0 г
хлорид натрия	3,0 г
карбонат кальция	45 г
вода	1000 см^3

Приготовление: безводные основные компоненты или сухую готовую основу добавляют к воде и кипятят. Устанавливают pH так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,0±0,1) при 20 °С.

Стерилизуют основу в течение 20 мин при температуре (121±1) °С.

6.2.2.2 Раствор тиосульфата натрия

Состав:

тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)	50,0 г
вода до общего объема	100 см^3

Приготовление: тиосульфат натрия растворяют в небольшом количестве воды, а затем доводят объем до 100 см^3.

Стерилизуют раствор в течение 20 мин при температуре (121±1) °С.

6.2.2.3 Йодный раствор

Состав:

йод	20,0 г
йодид калия	25,0 г
вода до общего объема	100 см^3

Приготовление: растворяют йодид калия в минимальном объеме воды, добавляют йод и встряхивают до полного растворения. Объем доводят водой до 100 см^3.

Раствор хранят в плотно укупоренном сосуде из непрозрачного стекла.

6.2.2.4 Раствор бриллиантового зеленого

Состав:

бриллиантовый зеленый	0,5 г
вода	100 см^3

Приготовление: добавляют бриллиантовый зеленый к воде. Оставляют раствор в темноте не менее чем на сутки, чтобы обеспечить самостерилизацию.

6.2.2.5 Раствор бычьей желчи

Состав:

бычья желчь сухая . . . . . 10,0 г
вода . . . . . 100 см^3

Приготовление: сухую бычью желчь растворяют в кипящей воде.

Стерилизуют раствор в течение 20 мин при температуре (121±1) °С.

6.2.2.6 Готовая среда

Состав:

основа (п. 6.2.2.1) . . . . . 900 см^3
раствор тиосульфата натрия (п. 6.2.2.2) . . . . . 100 см^3
йодный раствор (п. 6.2.2.3) . . . . . 20 см^3
раствор бриллиантового зеленого (п. 6.2.2.4) . . . . . 2 см^3
раствор бычьей желчи (п. 6.2.2.5) . . . . . 50 см^3

Приготовление: в асептических условиях к основе добавляют компоненты в вышеуказанном порядке. После каждого добавления жидкость хорошо перемешивают. Разливают готовую среду по 100 см^3 в стерильные колбы вместимостью 500 см^3. Хранят ее при температуре 4 °С в темноте не более недели.

6.2.3 Среда селенитовая с бриллиантовым зеленым (Стокса и Осборна)

6.2.3.1 Основа

Состав:

пептон . . . . . 5,0 г
дрожжевой экстракт . . . . . 5,0 г
маннит . . . . . 5,0 г
таурохолат натрия . . . . . 1,0 г
гидроселенит натрия . . . . . 4,0 г
вода . . . . . 900 см^3

Приготовление: растворяют первые четыре ингредиента (т. е. безводные основные компоненты или сухую готовую основу) в кипящей воде в течение 5 мин. После охлаждения добавляют гидроселенит натрия, доводят pH до (7,0±0,1) при 20 °С.

Хранят ее при температуре 4 °С в темноте не более недели.

6.2.3.2 Буферный раствор

Состав:

Раствор А

дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4) . . . . . 34,0 г
вода . . . . . 1000 см^3

Растворяют дигидроортофосфат калия в воде:

Раствор Б

гидроортофосфат калия (K_2HPO_4) . . . . . 43,6 г
вода . . . . . 1000 см^3

Растворяют гидроортофосфат калия в воде.

Приготовление: смешивают два объема раствора А и три объема раствора Б, получая раствор с pH (7,0±0,1) при 20 °С.

6.2.3.3 Раствор бриллиантового зеленого

Состав и приготовление этого раствора — по п. 6.2.2.4.

6.2.3.4 Готовая среда

Состав:

основа (п. 6.2.3.1) . . . . . 900 см^3
буферный раствор (п. 6.2.3.2) . . . . . 100 см^3
раствор бриллиантового зеленого (п. 6.2.3.3) . . . . . 1 см^3

Приготовление: к основе добавляют буферный раствор, нагревают до 80 °С, охлаждают и добавляют раствор бриллиантового зеленого. Разливают готовую среду по 100 см^3 в стерильные колбы вместимостью 500 см^3.

Используют среду в день приготовления.

6.2.4 Агар с бриллиантовым зеленым и феноловым красным (Эделя и Кампельмахера)

6.2.4.1 Основа

Состав:

мясной экстракт . . . . . 4,0 г
пептон . . . . . 10,0 г

хлорид натрия . . . . . 3,0 г
гидроортофосфат натрия (Na_2HPO_4) . . . . . 0,8 г
дигидроортофосфат натрия (NaH_2PO_4) . . . . . 0,6 г
агар быстрорастворимый* . . . . . 12,0 г
вода . . . . . 900 см^3

Приготовление: растворяют безводные основные компоненты или сухую готовую основу в кипящей воде. Устанавливают pH так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,0±0,1) при 40 °С. Разливают основу в пробирки или колбы вместимостью не более 500 см^3 и стерилизуют в течение 15 мин при температуре (121±1) °С.

6.2.4.2 Сахарный раствор с феноловым красным

Состав:

лактоза . . . . . 10,0 г
сахароза . . . . . 10,0 г
феноловый красный . . . . . 0,09 г
вода до общего объема . . . . . 100 см^3

Приготовление: растворяют ингредиенты в воде, нагревают на водяной бане в течение 20 мин при температуре 70 °С, охлаждают до 55 °С и сразу используют.

6.2.4.3 Раствор бриллиантового зеленого

Состав и приготовление раствора — по п. 6.2.2.4.

6.2.4.4 Готовая среда

Состав:

основа (п. 6.2.4.1) . . . . . 900 см^3
сахарный раствор с феноловым красным (п. 6.2.4.2) . . . . 100 см^3
раствор бриллиантового зеленого (п. 6.2.4.3) . . . . . 1 см^3

Приготовление: в асептических условиях к сахарному раствору с феноловым красным, охлажденному приблизительно до 55 °С, добавляют раствор бриллиантового зеленого. Перемешивают, добавляют к основе при температуре 50—55 °С и снова перемешивают.

6.2.4.5 Приготовление чашек с агаровой средой

В стерильные чашки Петри большого размера разливают примерно по 40 см^3 свежеприготовленной среды (п. 6.2.4.4), имеющей температуру приблизительно 45 °С (если в наличии нет больших чашек Петри, то расплавленную среду разливают в стерильные маленькие чашки Петри примерно по 15 см^3), дают застыть.

Непосредственно перед использованием чашки осторожно подсушивают в сушильном шкафу или термостате при температуре (50±5) °С в течение 30 мин, сняв крышки и перевернув вверх дном (агаровой поверхностью вниз).

Если чашки приготовили заранее, то их хранят не более 4 ч при комнатной температуре или не более суток в холодильнике (без подсушивания).

6.2.5 Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью

Состав:

дрожжевой экстракт . . . . . 3,0 г
пептон . . . . . 7,0 г
желчные соли . . . . . 1,5 г
лактоза . . . . . 10,0 г
хлорид натрия . . . . . 5,0 г
нейтральный красный . . . . . 0,03 г
кристаллический фиолетовый . . . . . 0,002 г
агар . . . . . 15,0 г
вода . . . . . 1000 см^3

Приготовление: растворяют безводные компоненты среды или сухую готовую среду в кипящей воде. Устанавливают pH так, чтобы после кипячения его значение составляло (7,4±0,1) при 40 °С. Разливают питательную среду в стерильные пробирки или колбы вместимостью не более 500 см^3. Стерилизация среды нежелательна.

Если среду приготовили заранее, ее хранят не более одной недели в холодильнике.

Приготовление чашек с агаровой средой.

* Известен под названием агар «Оксоид № 1».

В стерильные маленькие чашки Петри разливают примерно по 15 $см^3$ расплавленной среды (п. 6.2.5) и далее готовят, как указано в п. 6.2.4.5.

6.2.6 Трехсахарный агар с железом (агар ТСЖ)

Состав:

мясной экстракт	3,0 г
дрожжевой экстракт	3,0 г
пептон	20,0 г
хлорид натрия	5,0 г
лактоза	10,0 г
сахароза	10,0 г
глюкоза	1,0 г
цитрат железа (III)	0,3 г
тиосульфат натрия	0,3 г
феноловый красный	0,024 г
агар	12,0 г
вода	1000 $см^3$

Приготовление: безводные компоненты среды или сухую готовую среду растворяют в кипящей воде. Устанавливают pH так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,4±0,1) при 40 °С. Разливают среду по 10 $см^3$ в пробирки диаметром 17—18 мм, стерилизуют в течение 10 мин при температуре (121±1) °С.

Допускается устанавливать пробирки в наклонном положении так, чтобы глубина вертикального столбика агара составляла не менее 2,5 см.

6.2.7 Агар с мочевиной (Кристенсена)

6.2.7.1 Основа

Состав:

пептон	1,0 г
глюкоза	1,0 г
хлорид натрия	5,0 г
дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4)	2,0 г
феноловый красный	0,012 г
агар	15,0 г
вода	1000 $см^3$

Приготовление: безводные компоненты основы или сухую готовую основу растворяют в кипящей воде. Стерилизуют основу в течение 20 мин при температуре (121±1) °С.

6.2.7.2 Раствор мочевины

Состав:

мочевина	400 г
вода до общего объема	1000 $см^3$

Приготовление: мочевину растворяют в воде, стерилизуют фильтрованием и проверяют стерильность. (Подробности способа стерилизации фильтрованием можно найти в соответствующем руководстве по микробиологии).

6.2.7.3 Готовая среда

Состав:

основа (п. 6.2.7.1)	950 $см^3$
раствор мочевины (п. 6.2.7.2)	50 $см^3$

Приготовление: в асептических условиях к основе добавляют раствор мочевины. Устанавливают pH так, чтобы его значение составляло (6,8±0,1) при 40 °С. Готовую среду разливают по 10 $см^3$ в стерильные пробирки. Допускается устанавливать пробирки в наклонном положении.

6.2.8 Агар питательный полужидкий

Состав:

мясной экстракт	3,0 г
пептон	5,0 г
агар	8,0 г
вода	1000 $см^3$

Приготовление: безводные основные компоненты растворяют в кипящей воде. Устанавливают pH так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,0±0,1) при 40 °С. Среду разливают в колбы вместимостью не более 500 $см^3$ и стерилизуют в течение 20 мин при температуре (121±1) °С.

Приготовление чашек с агаровой средой

В стерильные маленькие чашки Петри разливают примерно по 15 $см^3$ свежеприготовленной среды. Чашки с агаровой средой не подсушивают.

6.2.9 Солевой раствор

Состав:

хлорид натрия . . . . . 8,5 г
вода . . . . . 1000 $см^3$

Приготовление: хлорид натрия растворяют в кипящей воде, устанавливают pH так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,0±0,1) при 20 °С. В колбы или пробирки разливают такое количество раствора, чтобы после стерилизации в них содержалось 90—100 $см^3$. Стерилизуют раствор в течение 20 мин при температуре (121±1) °С.

6.2.10 Среда декарбоксилирования лизина

Состав:

1-лизин моногидрохлорид . . . . . 5,0 г
дрожжевой экстракт . . . . . 3,0 г
глюкоза . . . . . 1,0 г
бромкрезоловый пурпуровый . . . . . 0,015 г
вода . . . . . 1000 $см^3$

Приготовление: растворяют все компоненты в кипящей воде, устанавливают pH так, чтобы после стерилизации его значение составляло (6,8±0,1) при 20 °С. Разливают среду по 5 $см^3$ в узкие бактериологические пробирки диаметром приблизительно 8 мм и длиной 160 мм. Стерилизуют среду в течение 10 мин при температуре (121±1) °С.

6.2.11 Реактив β-галактозидазы

6.2.11.1 Буферный раствор

Состав:

дигидроортофосфат натрия (NaH_2PO_4) . . . . . 6,9 г
гидроксид натрия, приблизительно 0,1 моль/$дм^3$ (4 г/$дм^3$)
раствор . . . . . 3 $см^3$
вода до общего объема . . . . . 50 $см^3$

Приготовление: растворяют дигидроортофосфат натрия приблизительно в 45 $см^3$ воды. Доводят pH до (7,0±0,1), приливая примерно 3 $см^3$ раствора гидроксида натрия. Объем доводят водой до 50 $см^3$. Хранят в холодильнике.

6.2.11.2 Раствор ОНФГ

Состав:

о-нитрофенил β-*D*-галактопиранозио (ОНФГ) . . . . . 80 мг
вода . . . . . 15 $см^3$

Приготовление: растворяют ОНФГ в воде при температуре 50 °С, раствор охлаждают.

6.2.11.3 Готовый реактив

Состав:

буферный раствор (п. 6.2.11.1) . . . . . 5 $см^3$
раствор ОНФГ (п. 6.2.11.2) . . . . . 15 $см^3$

Приготовление: к раствору ОНФГ добавляют буферный раствор. Хранят готовый реактив при температуре 4 °С не более 1 мес.

6.2.12 Реакция Вогса — Проскаэра (ускоренный метод Барри и Финея)

6.2.12.1 Среда ВП

Состав:

пептон . . . . . 7,0 г
глюкоза . . . . . 5,0 г
гидроортофосфат калия (K_2HPO_4) . . . . . 5,0 г
вода . . . . . 1000 $см^3$

Приготовление: компоненты растворяют в воде, доводят pH до 6,9 и фильтруют. Стерилизуют среду в течение 20 мин при температуре 115 °С.

6.2.12.2 Раствор креатина

Состав:

креатин моногидрат . . . . . 0,5 г
вода . . . . . 100 $см^3$

Приготовление: моногидрат креатина растворяют в воде.

6.2.12.3 Реактив α-нафтола (спиртовый раствор α-нафтола)

Состав:

α-нафтол . . . . . 6 г

этиловый спирт, 96 % /V/V/ . . . . . 100 см^3

Приготовление: α-нафтол растворяют в этиловом спирте.

6.2.12.4 Реактив КОН

Состав:

гидроксид калия . . . . . 40 г

вода . . . . . 100 см^3

Приготовление: гидроксид калия растворяют в воде.

6.2.13 Индольная реакция

6.2.13.1 Триптон-триптофановая среда (по Лютову)

Состав:

триптон . . . . . 10 г

хлорид натрия . . . . . 5 г

DL-триптофан . . . . . 1 г

вода . . . . . 1000 см^3

Приготовление: компоненты растворяют в воде при температуре 100 °С и фильтруют. Доводят pH до 7,5.

6.2.13.2 Реактив (Ковакса)

Состав:

р-диметиламинобензальдегид . . . . . 5 г

соляная кислота (ρ_{20}-1,18—1,19 г/мл) . . . . . 25 см^3

третамиловый спирт . . . . . 75 см^3

Приготовление: смешивают все компоненты.

6.3 Сыворотки

Некоторые антисальмонеллезные сыворотки продаются в готовом виде, а именно: антисыворотки, содержащие одну или несколько «*O*» — групп (так называемые моно- или поливалентные *O*-антисыворотки). V_i-антисыворотки и антисыворотки, содержащие одну или несколько «Н»-групп (так называемые моно- или поливалентные Н-антисыворотки). При использовании сывороток следует руководствоваться инструкциями, прилагаемыми к ним изготовителем.

7 Аппаратура и стеклянная посуда

7.1 Аппаратура

Мясорубка механическая лабораторного типа, стерильная, с решеткой, диаметр отверстий которой не более 4 мм.

Смеситель механический, работающий со скоростью от 8000 до 45000 об/мин со стеклянными или металлическими банками для смешивания, с крышками, разной вместимости, устойчивыми к условиям стерилизации.

Аппаратура для стерилизации стеклянной посуды, банок для смешивания, питательных сред и т. д., а также оборудование для стерилизации фильтрованием, например асбестовая прокладка, мембранный фильтр или фильтровальная свеча соответствующей пористости.

Шкаф сушильный или духовой или термостат для подсушивания поверхности агаровой среды в чашках предпочтительно при температуре (50±5) °С.

Термостат для выдерживания жидких сред, чашек и пробирок с посевами при температуре (37±1) °С.

Термостат или водяная баня для выдерживания жидких сред с посевом при температуре 42—43 °С.

Водяные бани для нагревания и охлаждения растворов и питательных сред до разных температур.

7.2 Стеклянная посуда

Стеклянная посуда должна быть устойчива к повторной стерилизации.

Пробирки и колбы бактериологические для стерилизации и хранения питательных сред, бактериологические пробирки диаметром 8 мм и длиной 160 мм для среды декарбоксилирования лизина (п. 6.2.10).

Цилиндр мерный вместимостью 100 см^3 с ценой деления 10 см^3 для приготовления питательных сред.

Пипетки градуированные номинальной вместимостью 10 и 1 см^3 с ценой деления соответственно 1,0 и 0,1 см^3.

Чашки Петри

Чашка большого размера

Чашка:

наружный диаметр . . . . . (140±2) мм
наружная высота. . . . . (30±2) мм
толщина стекла. . . . . (1,5±0,5) мм.

Край чашки должен быть ровным, параллельным основанию. Дно чашки должно быть плоским и ровным.

Крышка:

наружный диаметр . . . . . (150±2) мм
наружная высота. . . . . (15±2) мм
толщина стекла. . . . . (1,5±0,5) мм

Чашка малого размера

Чашка:

наружный диаметр . . . . . (90±2) мм
наружная высота, не менее . . . . . 18 мм

Край должен быть ровным, параллельным основанию. Дно чашки должно быть плоским и ровным.

Крышка:

наружный диаметр, не более. . . . . 102 мм

Вместо стеклянных можно использовать пластмассовые чашки Петри, размеры которых такие же или незначительно отличаются от указанных размеров.

7.3 Стерилизация стеклянной посуды

Стерилизуют стеклянную посуду одним из следующих способов:

влажная стерилизация при температуре не менее 121 °С в течение не менее 20 мин;

сухая стерилизация при температуре не менее 170 °С в течение не менее 1 ч.

8 Отбор проб

Пробу отбирают массой не менее 200 г (см. ГОСТ 9958).

Отобранную пробу можно хранить в лаборатории при температуре 0—5 °С не более 24 ч.

9 Проведение анализа

9.1 Предварительная обработка пробы

Пробу дважды пропускают через мясорубку, перемешивают и сразу приступают к анализу. При необходимости измельченную пробу можно хранить при температуре 0—5 °С не более 1 ч.

9.2 Навеска

Взвешивают 25 г измельченного мяса или мясного продукта (п. 9.1) в стерильную банку смесителя.

9.3 Приготовление гомогената

В банку смесителя добавляют 225 см^3 буферной пептонной воды и гомогенизируют. Число оборотов смесителя должно составлять 15000—20000, а время — не более 2,5 мин.

Примечание — При определении присутствия или отсутствия сальмонелл в небольших навесках мяса (например, 1,0 или 0,1 г) соответствующую часть гомогената мяса (например, 10 или 1 см^3) добавляют к 100 см^3 буферной пептонной воды и далее проводят анализ, как указано ниже, учитывая при обработке результатов действительное количество мяса, подвергавшееся анализу.

9.4 Предварительное обогащение

9.4.1 В асептических условиях переносят содержимое смесительной банки в стерильную колбу вместимостью 500 см^3.

9.4.2 Колбу выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С не менее 16 и не более 20 ч.

9.5 Обогащение

9.5.1 После инкубационного периода переносят по 10 см^3 содержимого колбы к 100 см^3 тетратионатной среды и к 100 см^3 селенитовой среды.

9.5.2 Посевы выдерживают в термостате в течение 2 сут на тетратионатной среде при температуре 42—43 °С, на селенитовой среде — при температуре (37±1) °С.

9.6 Посев на чашках

9.6.1 После инкубационного периода в течение 18—24 ч из каждой колбы с помощью петли диаметром 2,5—3 мм делают посев штрихами на поверхность агаровой среды с бриллиантовым зеленым и феноловым красным. При необходимости подобным образом делают посев на поверхность одной из следующих плотных сред, приготовленных в лаборатории в качестве селективно-диагностических для выявления сальмонелл, таких как висмут-сульфитный агар, агар S.S., дезоксихолатцитратный агар и др., так, чтобы получить хорошо изолированные колонии (если в наличии нет больших чашек Петри, можно делать посев штрихами на две маленькие чашки, используя одну и ту же петлю).

9.6.2 Чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С, положив их вверх дном.

9.6.3 После инкубационного периода в течение 2 сут делают пересев на чашки двух обогащенных сред и помещают чашки в термостат при температуре (37±1) °С.

9.6.4 После выдерживания в термостате в течение 20—24 г определяют присутствие сальмонелл на чашках. Типичные колонии сальмонелл на агаре с бриллиантовым зеленым имеют розовую окраску.

9.6.5 Если рост микроорганизмов выражен слабо и не наблюдается типичных колоний сальмонелл, культуру повторно выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С в течение 20—24 ч. Затем снова определяют присутствие типичных колоний сальмонелл.

Примечание — Присутствие любых типичных или предполагаемых колоний должно быть подтверждено (см. п. 9.7), так как распознавание колоний сальмонелл в значительной степени зависит от опытности лица, проводящего анализ, а внешний вид колоний изменяется не только в зависимости от разновидностей сальмонелл, но и от партий среды. В связи с этим рекомендуется для лучшего распознавания колоний агглютинировать их поливалентной антисывороткой.

9.7 Подтверждение присутствия предполагаемых колоний сальмонелл

9.7.1 Выбор колоний для подтверждения

9.7.1.1 Из каждой чашки с каждой селективной средой выбирают пять типичных или предполагаемых колоний для подтверждения.

9.7.1.2 Если на одной чашке имеется менее пяти типичных или предполагаемых колоний, то для подтверждения берут все имеющиеся колонии.

9.7.1.3 Отобранные колонии высевают штрихами на подсушенную поверхность агаровой среды с кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным, желчью и лактозой таким образом, чтобы обеспечить развитие хорошо изолированных колоний.

9.7.1.4 Чашки с посевом выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С в течение 20—24 ч.

9.7.1.5 Для биохимического и серологического подтверждения используют чистые бесцветные колонии (лактозо-отрицательные).

9.7.2 Биохимическое подтверждение

9.7.2.1 Посев изолированных лактозоотрицательных колоний и выдерживание в термостате

Посев проводят на следующие среды.

9.7.2.1.1 Трехсахарный агар с железом (агар ТСЖ)

Посевы делают сначала штрихами по поверхности, а затем вглубь столбика агара. Выдерживают в течение 1—2 сут при температуре (37±1) °С.

Интерпретируют изменения среды следующим образом:

Столбик	
желтый	глюкоза конвертирована
красный или без изменений	глюкоза не конвертирована
черный	образование сероводорода
пузырьки или трещинки	выделение газа глюкозой

Косая поверхность

желтая	лактоза и(или) сахароза конвертирована
красная или без изменений	ни лактоза, ни сахароза не конвертирована

9.7.2.1.2 Агар с мочевиной (Кристенсена)

Делают посев штрихами на косую поверхность агара. Выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С в течение 1—2 сут.

В результате расщепления мочевины выделяется аммиак, который изменяет окраску фенолового красного на розовую, а затем на темно-вишневую.

9.7.2.1.3 Среда декарбоксилирования лизина

Делают посев на поверхность жидкой среды. Выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С в течение 1 сут. Появление темно-красной окраски после начала роста колоний указывает на положительную реакцию. Желтая окраска указывает на отрицательную реакцию.

9.7.2.1.4 Реактив β-галактозидазы

Подвешивают петлю с предполагаемой колонией в пробирке с 0,25 $см^3$ солевого раствора. Добавляют одну каплю толуола и встряхивают пробирку. На несколько минут помещают пробирку на водяную баню при температуре (37±1) °С. Затем добавляют 0,25 $см^3$ реактива β-галактозидазы и перемешивают. Снова помещают пробирку на водяную баню при температуре (37±1) °С на 24 ч (см. примечание). Желтая окраска указывает на положительную реакцию.

Примечание — Реакция проявляется через 20 мин.

9.7.2.1.5 Реакция Вогса — Проскаэра — реактив ВП

В две пробирки, содержащие по 0,2 $см^3$ среды петлей пересевают предполагаемые колонии. Одну из пробирок выдерживают при комнатной температуре, а другую — при 37 °С в течение 1 сут. Затем в каждую пробирку добавляют по две капли раствора креатина, три капли спиртового раствора α-нафтола и две капли реактива КОН, встряхивая после каждого добавления.

Изменение розового цвета на ярко-красный в течение 15 мин указывает на положительную реакцию.

9.7.2.1 Индольная реакция — триптон-триптофановая среда (по Лютову) или реактив Ковакса

Делают посев предполагаемой колонии в пробирку с 5 $см^3$ среды. Выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч. Затем добавляют 1 $см^3$ индольного реактива. Образование красного кольца указывает на положительную реакцию. Желтовато-коричневое кольцо указывает на отрицательную реакцию.

9.7.2.2 Интерпретация результатов (см. таблицу)

9.7.3 Серологическое подтверждение

Проверяют чистые несамоагглютинирующие колонии на присутствие *O*, V_i или H антигенов сальмонелл путем агглютинирования сывороткой на предметном стекле.

Реакция, указывающая на присутствие сальмонелл*	Положительная или отрицательная реакция	Процентное содержание серотипов сальмонелл, дающих реакцию**
ТСЖ глюкоза (образование кислоты)	+	100
ТСЖ глюкоза (образование газа)	+	91,9
ТСЖ лактоза	—***	99,2
ТСМ сахароза	—	99,5
ТСЖ сероводород	+	91,6
Разложение мочевины	—	100
Декарбоксилирование лизина	+	94,6
Реакция на β-галактозидазу	—***	98,5
Реакция Вогса — Проскаэра	—	100
Индольная реакция	—	98,9

* См. также В.Х. Эвинг и М.М. Болл. Биохимические реакции сальмонелл (1966). Национальный центр по изучению инфекционных заболеваний. Атланта, штат Джорджия, США.

** Процентное содержание указывает на то, что не все штаммы сальмонелл дают положительные или отрицательные реакции, и оно может изменяться в зависимости от вида продукта или места изготовления.

*** Подвид III сальмонелл (Аризона) может давать положительную реакцию на лактозу и β-галактозидазу. Подвид II сальмонелл может давать отрицательную реакцию на лактозу, но положительную на β-галактозидазу.

9.7.3.1 Удаление самоагглютинирующих штаммов

На тщательно очищенное предметное стекло помещают одну каплю солевого раствора. Растирают в этой капле некоторое количество исследуемой культуры до получения однородной мутной суспензии. Осторожно покачивают стекло в течение 30—60 с. Помещают стекло на темный фон и рассматривают через лупу. Штаммы считают самоагглютинирующими, если бактерии собрались в более или менее обособленные группы.

Серологическое подтверждение таких самоагглютинирующих штаммов в соответствии с пп. 9.7.3.2—9.7.3.4 провести невозможно.

9.7.3.2 Проверка на *О*-антигены

Используют чистые несамоагглютинирующие колонии. Проводят анализ, как указано в п. 9.7.3.1, используя О-антисыворотку вместо солевого раствора. Моно- и поливалентные сыворотки используют одну за другой.

9.7.3.3 Проверка на V_i-антигены

Проводят анализ, как указано в п. 9.7.3.2, но вместо солевого раствора используют одну каплю V_i-антисыворотки.

9.7.3.4 Проверка на Н-антигены

Делают пересев чистой несамоагглютирующей колонии на полужидкий питательный агар. Выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С в течение 18—24 ч. Проверяют полученную культуру на Н-антигены, как указано в п. 9.7.3.2, но вместо солевого раствора используют каплю Н-антисыворотки.

9.7.3.5 При отсутствии агглютинации реакции считают положительными.

9.7.4 Интерпретация результатов

9.7.4.1 Штаммы, дающие типичные биохимические реакции (п. 9.7.2) и положительные серологические реакции согласно пп. 9.7.3.2—9.7.3.4, относят к роду сальмонелл.

9.7.4.2 Штаммы, дающие типичные биохимические реакции (п. 9.7.2), но не дающие положительные серологические реакции согласно пп. 9.7.3.2—9.7.3.4, и штаммы, не дающие типичные биохимические реакции (п. 9.7.2), но дающие положительные серологические реакции согласно пп. 9.7.3.2—9.7.3.4, а также самоагглютинирующие штаммы (п. 9.7.3.1) дающие типичные биохимические реакции (п. 9.7.2), предположительно могут быть отнесены к сальмонеллам.

9.7.4.3 Штаммы, не дающие типичные биохимические реакции (п. 9.7.2) и позитивные серологические реакции согласно пп. 9.7.3.2—9.7.3.4, нельзя отнести к роду сальмонелл.

9.7.5 Окончательное подтверждение

Штаммы, отнесенные к роду сальмонелл (п. 9.7.4.1) или предположительно отнесенные к роду сальмонелл (п. 9.7.4.2), отсылают в официальный Центр по распознаванию сальмонелл для окончательного подтверждения. Посылку сопровождают подробной информацией относительно штаммов.

10 Обработка результатов

Если после посева на чашки сальмонеллы не были обнаружены ни в одной из обогащенных сред, в протоколе записывают:

«В 25 г исследованного продукта (см. примечание) сальмонеллы обнаружены не были (в качестве второй плотной селективной среды использовалось . . .)».

Если после посева на чашки сальмонеллы были обнаружены в одной или обеих обогащенных средах, в протоколе записывают:

«В 25 г исследованного продукта (см. приложение) были обнаружены сальмонеллы (в качестве второй плотной селективной среды использовалось . . .). Обнаруженные сальмонеллы относятся к следующим видам . . . ».

Кроме того, указывают, проводилось ли серологическое определение.

Примечание. Указывается количество продукта, которое было взято для анализа (см. примечание к п. 9.3).

11 Протокол испытания

Результаты анализов указывают в соответствии с требованиями разд. 10. Кроме того, при обнаружении сальмонелл указывают, на какой из двух обогащенных сред и на какой плотной селективной среде были обнаружены сальмонеллы.

Проводят ссылку на настоящий стандарт. Указывают точное название центра, в котором проводилась окончательная идентификация штаммов. Указывают вторую плотную селективную среду (если она использовалась). В протоколе указывают также все сведения, необходимые для полной идентификации пробы.

ПРИЛОЖЕНИЕ
(обязательное)

Требования к бриллиантовому зеленому

1 Бактериологические характеристики

Бриллиантовый зеленый сдерживает распространение proteus на агаре с бриллиантовым зеленым и феноловым красным (п. 6.2.4) и не препятствует в то же время росту сальмонелл.

2 Метод испытания

2.1 Среда

Приготовляют агар с бриллиантовым зеленым и феноловым красным (см. п. 6.2.4) с различной концентрацией бриллиантового зеленого в пределах 4,5—6 мг/дм^3.

2.2 Проведение испытания

На одной серии чашек с различной концентрацией бриллиантового зеленого делают посев чистой культуры proteus, а на другой такой же серии — посев чистой культуры Salmonella и выдерживают все чашки в термостате при температуре 37 °С не более 24 ч.

Достаточная концентрация красителя обеспечит развитие типичных розовых колоний сальмонелл диаметром 1—2 мм и ограниченный рост proteus, т. е. нераспространение.

Концентрация бриллиантового зеленого, которая даст вышеуказанный результат, может быть использована при приготовлении его раствора (п. 6.2.2.4).

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 226 «Мясо и мясная продукция»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 25 декабря 1992 г. № 1567

Настоящий стандарт подготовлен методом прямого применения международного стандарта ИСО 3565—75 Мясо и мясные продукты. Микробиологические исследования на сальмонеллу (арбитражный метод) и полностью ему соответствует

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Январь 2010 г.

gost.e-ecolog.ru