ГОСТ Р 50396.5—92

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО ПТИЦЫ, СУБПРОДУКТЫ И ПОЛУФАБРИКАТЫ ПТИЧЬИ

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ЛИСТЕРЕЛЛ

Издание официальное

БЗ 6—92/666

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.54:576.8.07:006.354 Группа Н19

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО ПТИЦЫ, СУБПРОДУКТЫ И ПОЛУФАБРИКАТЫ ПТИЧЬИ

Методы выявления и определения количества листерелл

ГОСТ Р 50396.5—92

Poultry meat, edible offal, ready-to-cook products. Methods for detection and quantity determination of Listeria

ОКСТУ 9209

Дата введения 01.01.94

Настоящий стандарт распространяется на предназначенные для реализации и промышленной переработки:

мясо птицы в виде потрошеных, полупотрошеных и потрошеных с комплектом потрохов и шеей тушек, частей, полученных при их разделке, а также обваленное и измельченное;

субпродукты и полуфабрикаты птичьи.

Стандарт устанавливает методы выявления и определения количества листерелл.

Метод выявления основан на высеве определенного количества продукта или смывов с его поверхности и (или) их разведений в жидкую среду, инкубировании при температуре (37±1)°С в течение (24±1)ч, в подтверждении принадлежности выросших микроорганизмов к листереллам по культурально-морфологическим свойствам, по биологическим пробам, по способности листерелл флуоресцировать при использовании люминесцирующей сыворотки.

Метод определения количества листерелл по методу наиболее вероятного числа (НВЧ) предназначен для проб, содержащих в 1 г менее 150, но в 10 г более 3 или в 1 см³ менее 15, но в 100 см³ более 3 листерелл.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ И ПОДГОТОВКА К ИССЛЕДОВАНИЯМ — по ГОСТ Р 50396.0

2. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Выявление листерелл по морфологическим и культуральным свойствам

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1993

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта России

2.1.1. Из мышц или паренхиматозных органов, костного и головного мозга готовят мазки-отпечатки, при этом из тканей вырезают стерильными ножницами кусочки размером 1,5×1,0× ×1,5 см³ и прикладывают поверхностями срезов к предметному стеклу по три отпечатка на двух предметных стеклах. Мазки высушивают, фиксируют, окрашивают по Граму по ГОСТ 10444.3.

Одновременно из исследуемого продукта готовят серии 10-кратных разведений по ГОСТ 26669 и проводят посев на мясо-пептонный бульон с глюкозой по ГОСТ 10444.1. После инкубирования в течение (24±1) ч при температуре (37±1)°С проводят пересев поверхностным методом по ГОСТ 26670 на питательный агар по ГОСТ Р 50396.0 пп. 2.4.2; 2.4.5, инкубируют в течение (24±1) ч при температуре (37±1)°С. Из мелких росинчатых прозрачных колоний готовят мазки с окрашиванием по Граму.

Для дальнейших исследований отбирают не менее 5 колоний, *в мазках которых обнаружены грамположительные короткие прямые* овоидные палочки, иногда почти кокки, расположенные одиночно или кучками. При этом в мазках-отпечатках обнаруживаются мелкие, часто полиморфные палочки, расположенные одиночно в виде римской цифры «пять» или частокола.

2.2. Биохимические свойства чистых культур испытывают на образование индола, сероводорода, каталазы, на разжижение желатина.

2.2.1. Для определения индола по стенке пробирки с суточной культурой на пептонной воде по ГОСТ Р 50396.0 п. 2.3.2, инкубированной при температуре (37±1)°С, добавляют 5—10 капель реактива Эрлиха или реактива Ковача по ГОСТ 28560. При наличии индола с реактивом Эрлиха через 5 мин в пограничном слое образуется ярко-красное кольцо, с реактивом Ковача через 10 мин после взбалтывания поверхность окрашивается в темно-красный цвет.

Листереллы индола не образуют.

2.2.2. Для определения сероводорода в пробирку с суточным посевом на пептонную воду помещают под пробку полоску фильтровальной бумаги по ГОСТ Р 50396.0 п. 2.3.21. Культуру инкубируют в течение 24—72 ч при температуре (37±1)°С. При выделении микроорганизмами сероводорода бумажка чернеет от образующегося сульфата свинца.

Листереллы сероводорода не образуют.

2.2.3. Для обнаружения каталазы в пробирку с культурой на мясо-пептонном бульоне, инкубированной в течение 12—24 ч при температуре (37±1)°С, добавляют 1 см³ раствора перекиси водорода массовой концентрации 100 г/дм³. При наличии каталазы жидкость вспенивается.

Листереллы образуют каталазу.

2.2.4. Для определения реакции на желатин проводят посев уколом в столбик среды по ГОСТ Р 50396.0 п. 2.4.35, погружая петлю с исследуемой культурой вглубь питательной среды до дна пробирки. Культуру инкубируют в течение 18—24 ч при температуре (37±1)°С. Вместе с опытными пробирками в термостат ставят одну или две пробирки с незасеянным желатином для контроля. После инкубирования пробирки, вынутые из термостата, опускают в холодную воду или ставят в холодильник. После застудневанія желатина в контрольных пробирках приступают к просмотру опытных. Там, где произошло расщепление белков желатина, отмечается его разжижение. При отсутствии разжижения желатина в опытных пробирках их вновь помещают в термостат и инкубируют в течение 48—72 ч при температуре (37±1)°С с ежесуточным просмотром.

Листереллы желатин не разжижают.

2.3. *Для подтверждения принадлежности культуры к листереллам* проводят биопробу на белых мышах или морских свинках. Белых мышей заражают внутримышечно, подкожно или интраперитонеально в дозе 0,3—1 $см^3$ в концентрации 10^5—10^6 КОЕ/$см^3$ суточной культуры с мясо-пептонного агара, смытой стерильным физиологическим раствором. У погибших в течение 2—5 сут животных обнаруживают многочисленные очаги некроза в печени, селезенке, почках и миокарде.

Морским свинкам на слизистую оболочку глаза вносят 1 - 2 капли инокулята. Через 18—24 ч появляется отек века, гиперемия, слезотечение, через 36—72 ч веко опухает, из глаза выделяется гнойный экссудат.

2.4. Метод выявления листерелл при помощи люминесцирующих антител используют, во-первых, в качестве экспресс-метода для предварительного определения листерелл с последующим подтверждением бактериологическим методом; во-вторых, для идентификации выделенной культуры, что исключает в ряде случаев определение их культуральных и биохимических свойств.

2.4.1. При экспресс-методе из свежего материала (мышц, паренхиматозных органов, костного, головного мозга) готовят взвесь в физиологическом растворе в соотношении 1:5. После осаждения крупных частиц взвеси из разных участков ее поверхности готовят по три мазка.

Место нанесения материала очерчивают карандашом по стеклу с обратной стороны; подсушивают мазки на воздухе, маркируют, фиксируют этиловым ректификованным спиртом с массовой долей 96%. При этом стекла с мазками, отделенные друг от друга, погружают в вертикальном положении на 15 мин в сосуд со спиртом. Изъятые из сосуда мазки после испарения спирта ополаскивают физиологическим фосфатно-буферным раствором по

ГОСТ Р 50396.0 п. 2.3.23. Допускается ополаскивать мазки физиологическим раствором или дистиллированной водой без фосфатного буфера.

На слегка подсушенный мазок наносят 1—2 капли соответствующей люминесцирующей сыворотки, подготовленной по инструкции, прилагаемой к сывороткам.

Мазки с сывороткой помещают во влажную камеру (в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой на дне) и выдерживают в термостате в течение (30±1) мин при температуре (37±1)°С. Затем сыворотку отмывают, погружая на 20 мин мазки в кювету с физиологическим фосфатно-буферным раствором. Раствор в кювете помешивают и меняют через 10 мин. Отмытые мазки ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

На поверхность мазка наносят каплю глицерина, накрывают покровным стеклом, излишек глицерина удаляют. На покровное стекло наносят нефлуоресцирующее иммерсионное масло или его заменитель и проводят люминесцентную микроскопию.

Диагностическая оценка интенсивности люминесценции листерелл следующая:

++++ — яркая, сверкающая, зеленая люминесценция палочек с более интенсивным свечением по их периферии (положительная);

+++ — отчетливо выраженная, достаточно яркая, зеленоватая люминесценция палочек с более интенсивным свечением по их периферии (положительная);

++ — недостаточно яркая желтовато-зеленоватая люминесценция; периферический ободок выявляется с с трудом (сомнительная);

\+ — люминесценция очень слабая, морфология бактерий различается с трудом (отрицательная);

— — люминесценция отсутствует, лишь видны тени бактерий (отрицательная).

Видовую принадлежность обнаруженных листерелл устанавливают по определенной сыворотке, которая вызывает специфическое свечение интенсивностью не менее чем на три креста.

2.4.2. При идентификации выделенной суточной культуры готовят не менее трех мазков на предметных стеклах. Подготовку и анализ мазков на люминесценцию проводят, как указано в п. 2.4.1 при экспресс-методе.

2.5. При определении количества листерелл по методу НВЧ высевают в мясо-пептонный бульон с глюкозой три последовательных 10-кратных разведения в 3-кратной повторности. Соотношение между количеством высеваемого материала и питательной средой 1 : 9. Инкубирование и анализ проводят, как указано в пп. 2.1.1—2.2.4, 2.4.2.

3. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

3.2. Микроорганизмы относят к листереллам при обнаружении в мазках-отпечатках из мышц, паренхиматозных органов, костного, головного мозга грамположительных палочек, расположенных одиночно, в виде частокола, а в мазках из культуры — в виде коротких овоидных палочек, не образующих индол и сероводород, каталазоположительных, не разжижающих желатин; при биопробе на морских свинках на слизистую оболочку глаза, вызывающих опухоль глаза и выделение гнойного экссудата; при биопробе на белых мышах — гибель животных с поражением внутренних органов.

3.3. Принадлежность к листереллам устанавливают по определенной сыворотке, которая вызывает люминесценцию исследуемой пробы интенсивностью свечения не менее чем на три креста.

3.4. Результаты выявления листерелл записывают: листереллы обнаружены или не обнаружены, при этом указывается навеска исследуемого продукта.

3.5. Подсчет микроорганизмов при определении их количества проводят по ГОСТ 10444.3.

3.6. Результаты определения количества листерелл записывают, как указано в ГОСТ Р 50396.1 п. 3.3.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Научно-производственным объединением птицеперерабатывающей промышленности «Комплекс», Техническим комитетом по стандартизации ТК 116 «Продукты переработки птицы, яиц и сублимационной сушки»

   РАЗРАБОТЧИКИ

   А. А. Гусев, д-р вет. наук (руководитель темы); Г. Г. Чернова, канд. биол. наук; М. М. Павликова, Г. А. Степанова

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 18.11.92 № 1496

3. Срок проверки — 1997 г., периодичность проверки — 5 лет

4. ВЗАМЕН ГОСТ 7702.2—74 в части метода выявления листерелл

5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 10444.1—84	2.1.1
ГОСТ 10444.3—85	2.1.1; 3.5
ГОСТ 26669—85	2.1.1
ГОСТ 26670—85	2.1.1
ГОСТ 28560—90	2.2.1
ГОСТ Р 50396.0—92	1; 2.1.1; 2.2.1; 2.2.2; 2.2.4 и 2.4.1
ГОСТ Р 50396.1—92	3.6

Редактор *Т. И. Василенко*
Технический редактор *Г. А. Теребинкина*
Корректор *Е. И. Морозова*

Сдано в наб. 07.12.92 Подп. в печ. 11.02.93 Усл. п. л. 0,5. Усл. кр.-отт. 0,5. Уч.-изд. л. 0,35. Тираж 777 экз.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14. Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 1724

gost.e-ecolog.ru