МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Издание официальное

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ
ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
Минск

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом мясной промышленности (ВНИМИ) и Межгосударственным и техническим комитетом по стандартизации МТК 186 «Молоко и молочные продукты»

ВНЕСЕН Госстандартом Российской Федерации

2 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 11 от 25 апреля 1997 г.)

За принятие проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа по стандартизации
Азербайджанская Республика	Азгосстандарт
Республика Армения	Армгосстандарт
Республика Беларусь	Госстандарт Беларуси
Киргизская Республика	Киргизстандарт
Республика Молдова	Молдовастандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Республика Таджикистан	Таджикгосстандарт
Туркменистан	Главная государственная инспекция Туркменистана
Республика Узбекистан	Узгосстандарт
Украина	Госстандарт Украины

3 Постановлением Государственного комитета Российской Федерации по стандартизации, метрологии и сертификации от 25 сентября 1997 г. № 341 межгосударственный стандарт ГОСТ 30347—97 введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта Российской Федерации с 1 июля 1998 г. с правом досрочного введения

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июль 2000 г.

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания на территории Российской Федерации без разрешения Госстандарта России

© ИПК Издательство стандартов, 1997
© ИПК Издательство стандартов, 2000
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2008
Переиздание (по состоянию на сентябрь 2008 г.)

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Средства контроля и вспомогательные устройства 1
3.1 Аппаратура, материалы, реактивы 1
3.2 Питательные среды 2
4 Порядок подготовки к проведению контроля 3
4.1 Приготовление растворов и реактивов 3
4.2 Отбор и подготовка проб 3
5 Порядок проведения контроля 3
5.1 Метод определения количества Staphylococcus aureus с предварительным обогащением . . 3
5.1.1 Подготовка и проведение контроля 3
5.1.2 Обработка результатов контроля 5
5.1.3 Оформление результатов контроля 5
5.2 Метод определения количества Staphylococcus aureus без предварительного обогащения . . 5
5.2.1 Проведение контроля 5
5.2.2 Обработка результатов контроля 5
5.2.3 Оформление результатов контроля 5
Приложение А Библиография 6

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Методы определения Staphylococcus aureus

Milk and milk products.
Methods for determination of staphylococcus aureus

Дата введения 1998—07—01

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочные продукты, закваски, бактериальные концентраты и препараты и устанавливает два метода определения Staphylococcus aureus в определенном объеме или навеске продукта — определение количества с предварительным обогащением; определение количества без предварительного обогащения.

Метод определения Staphylococcus aureus с предварительным обогащением основан на высеве навески продукта и разведении его в жидкую селективную среду, инкубировании посевов, учете положительных пробирок (колб), пересеве на плотные селективные среды с последующим подтверждением принадлежности выросших колоний к Staphylococcus aureus.

Метод определения количества Staphylococcus aureus без предварительного обогащения посевом на агаризованные селективные среды основан на высеве продукта или разведении его на поверхности плотной среды, инкубировании, подсчете типичных колоний Staphylococcus aureus с последующим подтверждением выросших колоний к Staphylococcus aureus по плазмокоагулирующей способности.

2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ*

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 9225—84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа
ГОСТ 10444.11—89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов
ГОСТ 27583—88 Яйца куриные пищевые. Технические условия

3 СРЕДСТВА КОНТРОЛЯ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА

3.1 Аппаратура, материалы, реактивы по ГОСТ 9225 со следующими дополнениями:
сухая плазма кроличья, цитратная;
контрольный штамм Staphylococcus aureus;
мембранные фильтры;
калия теллурит [2], раствор с массовой концентрацией 10 г/дм^3;
глицин [1], раствор с массовой концентрацией 200 г/дм^3;
кристаллический фиолетовый [6];
натрия пируват [8], раствор с массовой концентрацией 200 г/дм^3;
литий хлористый, гексагидрат [4];
триптон;
экстракт дрожжевой [3] или
экстракт дрожжевой, очищенный [7];
экстракт мясной;
фуксин основной [5], спиртовой раствор с массовой концентрацией 50 г/дм^3;
яйца куриные пищевые по ГОСТ 27583;
витаминный препарат «ЭКД» сухой [11].

Издание официальное

* См. примечание ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» (с. 8).

3.2 Питательные среды

3.2.1 Гидролизованное и стерильное обезжиренное молоко по ГОСТ 10444.11 (3.3.1 и 3.3.3).

3.2.2 Среды питательные сухие для определения Staphylococcus aureus [9] или питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой и питательный агар сухой II, выпускаемые Дагестанским НПО «Питательные среды» [10].

3.2.3 Желточную эмульсию готовят следующим образом.

Свежее куриное яйцо моют водопроводной водой, затем протирают ваткой, смоченной в спирте, и обсушивают. Отделяют желток и вносят его в 100 см^3 стерильного раствора хлористого натрия по ГОСТ 9225. Тщательно перемешивают. Приготовленная эмульсия может храниться при температуре 0—5 °С не более 72 ч.

3.2.4 Солевой бульон*:

Состав: натрий хлористый (NaCl) — 7,5 г;
питательный сухой бульон — 1,5 г;
или гидролизованное молоко — 100 см^3.

Приготовление: в 100 см^3 дистиллированной воды вносят 1,5 г сухого питательного бульона, кипятят 1—2 мин, фильтруют через ватный тампон, добавляют 7,5 г NaCl, устанавливают pH (6,9 ± 0,1).

Разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (10 ± 1) мин.

Или к 100 см^3 гидролизованного молока добавляют 7,5 г NaCl, устанавливают pH (6,9 ± 0,1), разливают и стерилизуют, как указано выше.

3.2.5 Желточно-солевой агар**

Состав: питательный агар***
для культивирования микроорганизмов (на основе гидролизата кильки) [10] — 35 г
или
питательный агар II***
(на основе гидролизата кормовых дрожжей) [10] — 24 г;
натрий хлористый (NaCl) — 75 г;
эмульсия желточная — 50,0 см^3;
вода дистиллированная — 1 дм^3.

Приготовление: в 1 дм^3 дистиллированной воды вносят 36 г питательного агара для культивирования микроорганизмов или 24 г питательного агара сухого II, добавляют 75 г хлористого натрия (NaCl), кипятят до полного расплавления агара, фильтруют через ватный тампон, разливают во флаконы или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (20 ± 1) мин. После стерилизации охлаждают до температуры (45 ± 1) °С и добавляют 50 см^3 предварительно подготовленной желточной эмульсии. Смесь тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Чашки со средой хранят в холодильнике не более 5 сут.

3.2.6 Молочно-солевой агар**

Состав: питательный агар*** для культивирования микроорганизмов (на основе гидролизата кильки) [10] — 35 г
или питательный агар II*** (на основе гидролизата кормовых дрожжей) [10] — 24,0 г;
натрий хлористый (NaCl) — 75,0 г;
молоко обезжиренное — 100 см^3;
вода дистиллированная — 1 дм^3.

Приготовление: среду готовят, указано в 3.2.5, но после охлаждения до температуры (45 ± 1) °С добавляют вместо желточной эмульсии 100 см^3 стерильного обезжиренного молока. Смесь тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Чашки со средой хранят в холодильнике не более 5 сут.

3.2.7 Агар Байрд-Паркера *[4]

Состав. Основа среды:
триптон — 10,0 г;
дрожжевой экстракт [3] — 1,0 г;

---

* Допускается применение солевого бульона [9], который готовится согласно указанию на этикетке.

** Допускается использовать солевой агар [9], который готовится согласно указанию на этикетке и к которому после стерилизации добавляется желточная эмульсия или обезжиренное молоко.

*** При изменении заводом-изготовителем количества вносимой среды на 1 дм^3 дистиллированной воды, количество среды вносится согласно указанию на этикетке.

*[4] Допускается использовать агар Байрд-Паркера [9]. Среда готовится согласно указанию на этикетке.

мясной экстракт — 5,0 г;
литий хлористый, гексагидрат [4] — 5,0 г;
агар — 12,0—20,0 г;
вода дистиллированная — 1 $дм^3$.
Раствор пирувата натрия:
пируват натрия [8] — 20,0 г;
вода дистиллированная — 100 $см^3$.
Раствор глицина:
глицин [1] — 20,0 г;
вода дистиллированная — 100,0 $см^3$.

3.2.7.1 Приготовление основы среды: в 1 $дм^3$ дистиллированной воды вносят 10 г триптона, 5 г мясного экстракта, 1 г дрожжевого экстракта, 5 г хлористого лития, 20 г агара.

При отсутствии триптона применяют гидролизат казеиновый сухой, а при отсутствии дрожжевого экстракта применяют витаминный препарат — «ЭКД» сухой [11].

При отсутствии мясного экстракта, триптона и дрожжевого экстракта вместо дистиллированной воды применяют 1 $дм^3$ мясопептонного бульона или питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой или питательный агар сухой II [10].

Все компоненты, внесенные в 1 $дм^3$ дистиллированной воды (мясопептонный бульон), нагревают и перемешивают до полного растворения, охлаждают до температуры 50—60 °С. Устанавливают pH (7,2 ± 0,1), разливают в колбы или бутылки по 90 $см^3$ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (20 ± 1) мин.

При использовании сухой среды в 1 $дм^3$ дистиллированной воды вносят 36 г питательного агара для культивирования микроорганизмов или 24 г питательного агара сухого II, добавляют 5 г хлористого лития. Нагревают до полного растворения, охлаждают до температуры 50—60 °С, устанавливают pH (7,2 ± 0,1), разливают и стерилизуют, как указано выше.

Готовую основу среды хранят не более 30 сут при температуре (6 ± 2) °С.

3.2.7.2 Перед использованием к 90 $см^3$ расплавленной основы среды добавляют асептически стерилизованные фильтрованием через мембранный фильтр растворы: 6,3 $см^3$ раствора глицина, 5 $см^3$ раствора пирувата натрия; 1 $см^3$ раствора теллурита калия; 5 $см^3$ желточной эмульсии.

Допускается растворы глицина, пирувата натрия, теллурита калия и желточную эмульсию готовить в асептических условиях на стерильной дистиллированной воде.

После тщательного перемешивания приготовленную среду разливают в чашки Петри.

Чашки со средой можно хранить не более 48 ч.

4 ПОРЯДОК ПОДГОТОВКИ К ПРОВЕДЕНИЮ КОНТРОЛЯ

4.1 Приготовление растворов и реактивов

4.1.1 Раствор плазмы кроличьей цитратной готовится согласно инструкции по применению плазмы, прилагаемой к упаковке.

4.1.2 Растворы и реактивы для окраски препаратов готовят по ГОСТ 9225.

4.1.3 *Приготовление реактивов для окраски по Граму*

4.1.3.1 Приготовление реактива 1

В 100 $см^3$ этилового спирта растворяют 0,5 г кристаллического фиолетового [6].

4.1.3.2 Приготовление реактива 2

К 96 $см^3$ спиртового раствора йодистого калия массовой концентрацией 5 г/$дм^3$ добавляют 2 $см^3$ спиртового раствора основного фуксина [5] массовой концентрацией 50 г/$дм^3$ и 2 $см^3$ спиртового раствора йода массовой концентрацией 50 г/$дм^3$.

Йодистый калий растворяют в спирте на водяной бане при температуре (45 ± 5) °С при постоянном помешивании.

4.2 Отбор и подготовка проб по ГОСТ 9225.

5 ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ КОНТРОЛЯ

5.1 Метод определения количества Staphylococcus aureus с предварительным обогащением

5.1.1 *Подготовка и проведение контроля*

5.1.1.1 Из навески продукта готовят ряд десятикратных разведений по ГОСТ 9225 так, чтобы

можно было определить наличие или отсутствие Staphylococcus aureus в определенной массе (объеме), указанной в нормативном документе на конкретный продукт.

5.1.1.2 Навеску продукта или его разведения засевают по 1 $см^3$ в пробирки или колбочки с солевым бульоном (3.2.4).

Соотношение между количеством высеваемого продукта или его эквивалентным разведением и питательной средой 1 : 10.

Пробирки и колбочки с посевами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч.

5.1.1.3 Для подтверждения принадлежности микроорганизмов, выросших на солевом бульоне, к Staphylococcus aureus делают пересев петлей из бульона для получения изолированных колоний на чашки Петри с подсушенными средами типа Байрд-Паркера (3.2.7), желточно-солевой агар или молочно-солевой агар (3.2.5; 3.2.6).

Чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

5.1.1.4 После термостатирования посевы просматривают и отмечают рост характерных колоний.

На желточно-солевом агаре колонии Staphylococcus aureus имеют форму плоских дисков диаметром 2—4 мм белого, желтого, кремового, лимонного, золотистого цвета с ровными краями; вокруг колоний образуется радужное кольцо и зона помутнения среды.

На молочно-солевом агаре колонии Staphylococcus aureus растут в виде непрозрачных круглых колоний, окрашенных от белого до оранжевого цвета, диаметром 2—4 мм, слегка выпуклых.

На среде Байрд-Паркера колонии Staphylococcus aureus растут в виде черных, блестящих, выпуклых колоний диаметром 1—1,5 мм, окруженных зоной просветления среды шириной 1—3 мм.

5.1.1.5 С каждой чашки Петри отбирают не менее пяти характерных колоний и пересеивают на поверхность скошенного питательного агара, как указано в 3.2.5, но без добавления хлористого натрия и желточной эмульсии.

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

У выросших колоний определяют отношение к окраске по Граму и коагулированию плазмы кролика.

5.1.1.6 Из пяти изолированных, характерных для Staphylococcus aureus колоний, делают препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Для приготовления препарата на чистое и охлажденное после фламбирования предметное стекло наносят петлей каплю дистиллированной воды, в которую вносят петлей небольшое количество агаровой культуры, не размешивая в воде. Затем вносят петлей каплю реактива 1, приготовленного по 4.1.3.1. Смесь распределяют на участке примерно 1 $см^2$, просушивают при температуре (20 ± 2) °С и фиксируют, медленно пронося предметное стекло над пламенем горелки. На одном стекле можно готовить по шесть — восемь мазков, отделяя их один от другого линиями, проведенными с лицевой стороны стекла.

Препарат ополаскивают водой и тщательно просушивают фильтровальной бумагой.

После просушивания на препарат наносят с избытком реактив 2, приготовленный по 4.1.3.2 так, чтобы жидкость покрыла всю поверхность стекла. Продолжительность окрашивания 0,5 —1 мин. После окрашивания препарат быстро ополаскивают проточной водой, направляя струю под углом на стекло, помещенное вертикально. Препарат просушивают фильтровальной бумагой и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой. Микробы, красящиеся по Граму, будут темно-фиолетового цвета, не красящиеся по Граму — красного цвета.

Стафилококки окрашиваются по Граму положительно (темно-фиолетового цвета), имеют шарообразную форму и располагаются скоплениями, чаще всего напоминающими гроздья винограда.

5.1.1.7 Постановка реакции плазмокоагуляции

В пробирку с 0,5 $см^3$ разведенной кроличьей плазмы вносят петлю суточной агаровой культуры. Внесенную культуру тщательно размешивают. Одну пробирку с плазмой оставляют незасеянной, а в другую засевают контрольный штамм Staphylococcus aureus (коагулазоположительный стафилококк). Пробирки помещают в термостат и выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 3—6 ч. Если через 6 ч коагуляции плазмы не произошло, то оставляют эти пробирки до 24 ч. Если через 24 ч плазма не свернулась, то испытуемую культуру стафилококка относят к коагулазоотрицательной.

При определении коагулазной активности реакцию считают отрицательной в тех случаях, когда в плазме не образуются отдельные нити или сгустки, или в тех случаях, когда в плазме появились отдельные нити (реакцию плазмокоагуляции оценивают на один плюс).

Реакцию считают положительной, если:

+ + + + — сгусток плотный;

+ + + — сгусток, имеющий небольшой отсек;

+ + — сгусток в виде взвешенного мешочка.

Все три варианта являются положительным результатом.

При получении положительной реакции считают, что в посевах обнаружен Staphylococcus aureus.

5.1.2 *Обработка результатов контроля*

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

5.1.3 *Оформление результатов контроля*

Морфологические, культуральные свойства и положительная реакция плазмокоагуляции свидетельствуют о присутствии коагулазоположительных стафилококков в засеянной массе продукта.

5.2 Метод определения количества Staphylococcus aureus без предварительного обогащения

5.2.1 *Проведение контроля*

5.2.1.1 1 $см^3$ жидкого продукта или его разведения (5.1.1) наносят на поверхность питательных сред (3.2.5 или 3.2.6 или 3.2.7) в 3 чашки Петри, тщательно растирают шпателем по поверхности питательной среды. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. Чашки Петри с посевами инкубируют дном вверх.

5.2.1.2 После термостатирования подсчитывают количество характерных колоний на каждой чашке Петри (5.1.4). С каждой чашки Петри отбирают не менее пяти характерных и/или подозрительных колоний Staphylococcus aureus, а в случае роста менее пяти — все колонии характерные для Staphylococcus aureus и пересевают на поверхность скошенного питательного агара, разлитого в пробирки, как указано в 3.2.5, но без добавления хлористого натрия и желточной эмульсии. Пробирки с посевами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч.

У выросших культур определяют отношение к окраске по Граму и коагулированию плазмы кролика в соответствии с требованиями 5.1.6 и 5.1.7.

5.2.2 *Обработка результатов контроля*

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

Если при изучении характерных колоний в 80 % случаев, то есть не менее чем в 4 из 5 колоний подтвержден рост Staphylococcus aureus, то считают, что все характерные колонии, выросшие на чашках Петри (5.1.7), принадлежат к Staphylococcus aureus. В остальных случаях количество Staphylococcus aureus определяют, исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для подтверждения.

5.2.3 *Оформление результатов контроля*

Количество колоний Staphylococcus aureus в 1 г или 1 $см^3$ X после определения его в определенной навеске продукта вычисляют по формуле

$$X = \frac{\sum n_1 \cdot 10^n + \sum n_2 \cdot 10^{n+1}}{2}, \qquad (1)$$

где $\sum n_1; \sum n_2$ — количество колоний, выросших на всех чашках Петри в пределах одного разведения или засеянного объема;

n — число десятикратных разведений.

Пример:

Подсчитываем количество колоний Staphylococcus aureus, выросших на трех засеянных чашках при посевах продукта или его разведений:

1 г или 1 $см^3$ продукта — 84 96 72

10^{-1} разведение — 9 10 7

$$X = \frac{(84 + 96 + 72) \cdot 10^0 + (9 + 10 + 7) \cdot 10^1}{2} = 256 \qquad (2)$$

10^{-1} разведение — 84 96 72

10^{-2} разведение — 99 10 7

$$X = \frac{(84 + 96 + 72) \cdot 10^1 + (9 + 10 + 7) \cdot 10^2}{2} = 2560\ . \qquad (3)$$

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

БИБЛИОГРАФИЯ

[1] — ТУ 6—09—09—200—84	Глицин для медицинских целей
[2] — ТУ 6—09—2060—77	Калий теллуристокислый водный
[3] — ТУ 6—09—3462—73	Экстракт дрожжевой. Технические условия
[4] — ТУ 6—09—3751—83	Литий хлорид 1-водный. Технические условия
[5] — ТУ 6—09—3804—82	Фуксин основной для микробиологических целей. Технические условия
[6] — ТУ 6—09—4119—75	Кристаллический фиолетовый. Технические условия
[7] — ТУ 6—09—4510—77	Экстракт дрожжевой очищенный. Технические условия
[8] — ТУ 6—09—08—990—75	Натрий пировиноградокислый. Технические условия
[9] — ТУ 10—02—02—789—176—94	Среды питательные сухие для определения Staphylococcus aureus. Технические условия
[10] ОКП 93 8511 0197 ФС 42—188 ВС—88	Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой и питательный агар сухой II, выпускаемые Дагестанским НПО «Питательные среды»
[11] ОКП 93 85630197 ФС 42386 ВС—91	Витаминный препарат «ЭКД» сухой

УДК 623.001.4:006.354 МКС 07.100.30 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: питательные среды, коагулазоположительные стафилококки, характерные колонии, окраска по Граму, коагулирование плазмы

ПРИМЕЧАНИЕ ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

Указанный в разделе 2 «Нормативные ссылки» к ГОСТ 30347—97:

ГОСТ 27583—88. На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52121—2003. Яйца куриные пищевые. Технические условия

Редактор *М.И. Максимова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Подписано в печать 13.08.2008. Формат 60×84$^{1}/_{8}$. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл.печ.л. 1,40.
Уч.-изд.л. 1,10. Тираж 114 экз. Зак. 1062.

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