
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
53665—
2009

**МЯСО ПТИЦЫ, СУБПРОДУКТЫ
И ПОЛУФАБРИКАТЫ ИЗ МЯСА ПТИЦЫ**

Метод выявления сальмонелл

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2012

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГУ «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 15 декабря 2009 г. № 1030-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2011 г.

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

© Стандартинформ, 2010
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2012

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

МЯСО ПТИЦЫ, СУБПРОДУКТЫ И ПОЛУФАБРИКАТЫ ИЗ МЯСА ПТИЦЫ

Метод выявления сальмонелл

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

Дата введения — 2011—01—01

1 Область применения

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

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 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 51652—2000 Спиртэтиловый ректифицированный из пищевого сырья. Технические условия

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

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

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

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

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

ГОСТ 26668—85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов

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

ГОСТ 26670—91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 28560—90 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*

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

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

П р и м е ч а н и е — 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 ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

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

3.2

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

[ГОСТ Р 52814—2007, пункт 3.2]

4 Сущность метода

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

5 Общие положения

5.1 Общие требования проведения микробиологических исследований — по ГОСТ Р ИСО 7218.

5.2 Требования безопасности при работе с микроорганизмами — по [1], [2] и [3]; с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007; с электрооборудованием — по ГОСТ 12.1.019; требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

5.3 Требования к персоналу — по ГОСТ Р ИСО 7218.

6 Средства измерений, аппаратура, материалы и реактивы

6.1 Аппаратура, материалы и реактивы по ГОСТ Р ИСО 7218, ГОСТ Р 50396.0 со следующими дополнениями:

посуда одноразовая для микробиологических исследований;

пипетки градуированные или автоматические вместимостью 10, 2, 1 см³ с градуировкой 0,5 и 0,1 см³ по ГОСТ 29227;

дозаторы для розлива питательных сред;

петля бактериологическая (1 мкл);

пипетки пастеровские;

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

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

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

бумага крепированная [4];

крафт-бумага;

пробки силиконовые, резиновые;

пеналы для стерилизации лабораторной посуды;

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

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

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

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

7 Подготовка к проведению исследования

7.1 Отбор и подготовка проб

Отбор и подготовка проб по ГОСТ Р ИСО 7218, ГОСТ Р 50396.0 со следующим дополнением: проба для проведения испытаний должна быть представительной, не поврежденной и не измененной в процессе транспортирования и временного хранения.

7.2 Подготовка посуды

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

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

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

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

7.2.3 Режим стерилизации посуды — по ГОСТ 26668.

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

7.2.5 Контроль посуды на стерильность проводят не реже одного раза в квартал по [3] и [5] на количество стерилизованной посуды, отобранный от партии не менее трех единиц. Партией считают любое количество посуды, прошедшей стерилизацию за один цикл работы одного стерилизатора.

7.3 Приготовление растворов, реактивов и сывороток

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

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

7.3.3 Раствор бриллиантового зеленого концентрации 5 г/дм³ по ГОСТ Р 50396.0.

7.3.4 Реактивы для реакции Фогес-Проскауера по ГОСТ Р 52814.

7.3.5 Реактив Эрлиха по ГОСТ 28560.

7.3.6 Реактив Ковача по ГОСТ 28560.

7.3.7 Спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ 51652.

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

7.3.9 Диски с углеводами для тестов на ферментацию сахаров.

7.3.10 Толуол.

7.3.11 β -галактозидный реактив по ГОСТ Р 52814.

7.3.12 Биохимические микротесты со специальной адаптированной базой данных.

7.3.13 Физиологический раствор по ГОСТ Р 50396.0.

7.3.14 Диагностикum латексный для серотипирования бактерий рода *Salmonella* [6].

7.3.15 Набор для подтверждения идентификации *Salmonella* с помощью латекс-теста [7].

7.3.16 Тест-наборы для биохимической идентификации бактерий рода *Salmonella*.

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

7.4 Приготовление питательных сред

7.4.1 Пептонно-буферная среда по ГОСТ Р 50396.0.

7.4.2 Селенитовая обогатительная среда по ГОСТ Р 52814.

7.4.3 Тетратионатный бульон (Мюллер-Кауфмана) по ГОСТ Р 50396.0.

7.4.4 Селенит-цистиновый накопительный бульон [8].

- 7.4.5 Магниевая среда по ГОСТ Р 50396.0.
- 7.4.6 Среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) по ГОСТ Р 52814.
- 7.4.7 Модифицированная полужидкая среда MSRV.
- 7.4.8 Висмут-сульфитный агар.
- 7.4.9 Среда Плоскирева.
- 7.4.10 Среда Эндо.
- 7.4.11 Среда Левина.
- 7.4.12 Бриллиантово-зеленый агар.
- 7.4.13 XLD-4 агар [9].
- 7.4.14 Агар тройной сахарный.
- 7.4.15 Агар Кристенсена с мочевиной по ГОСТ Р 52814.
- 7.4.16 Бульон Хоттингера по ГОСТ 10444.1.
- 7.4.17 Среды с углеводами (среды Гисса).
- 7.4.18 Трехсахарный железистый агар (TSI-агар).
- 7.4.19 Скошенный столбик мясо-пептонного агара по ГОСТ Р 50396.0.
- 7.4.20 Триптон-триптофановая среда по ГОСТ Р 52814.
- 7.4.21 Скошенный столбик агара Симмонса по ГОСТ Р 50396.0.
- 7.4.22 Среда Клиглера.
- 7.4.23 Среда SIM для идентификации [10].
- 7.4.24 Среда Ресселя — ГРМ.
- 7.4.25 Среда Олькеницкого.
- 7.4.26 Среда для реакции Фогес-Проскауера по ГОСТ Р 52814.
- 7.4.27 L-лизиндекарбоксилазная среда по ГОСТ Р 52814.
- 7.4.28 ONPG-диски для определения β -галактозидазной активности.
- 7.4.29 Модифицированная полужидкая среда MSRV.
- 7.4.30 Столбик полужидкого питательного агара по ГОСТ Р 50396.0.
- 7.4.31 Мясо-пептонный агар по ГОСТ Р 50396.0.
- 7.4.32 Мясо-пептонный бульон с 1 % глюкозы по ГОСТ Р 50396.0.
- 7.4.33 Пептонная вода по ГОСТ Р 50396.0.
- 7.4.34 VP-среда по ГОСТ Р 52814.
- 7.4.35 ГРМ-агар.
- 7.4.36 Допускается использование других готовых и сухих, в том числе хромогенных питательных сред отечественного и зарубежного производства, разрешенных и зарегистрированных в Российской Федерации, предназначенных для выявления и идентификации бактерий рода *Salmonella*.
- 7.4.37 Приготовление и правила использования сред — по прописям производителя.
- 7.4.38 Каждое опытное употребление питательных сред должно давать гарантию их годности для выявления бактерий рода *Salmonella*. Стандартные методы контроля бактериологических питательных сред по ГОСТ Р ИСО 11133-1 и [11].
- 7.4.39 Контроль питательных сред на стерильность**
- Питательные среды проверяют на стерильность путем выдержки в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Если после этого на плотных питательных средах не обнаруживается колоний микроорганизмов, а в жидких средах нет помутнения или осадка, свидетельствующих о росте микроорганизмов, они считаются стерильными.
- 7.4.40 Сроки и условия хранения питательных сред — по ГОСТ Р ИСО 11133-1 и [11].

8 Проведение исследований

8.1 Предварительное неселективное обогащение

- 8.1.1 Предварительное неселективное обогащение направлено на выявление в испытуемой пробе небольшого числа бактерий рода *Salmonella* и поврежденных бактерий рода *Salmonella*.
- 8.1.2 Для приготовления исходной суспензии используют неселективную пептонно-буферную среду (см. 7.4.1) или другую среду для предварительного неселективного обогащения (см. 7.4.36). Для большего эффекта перед внесением навески продукта пептонно-буферную среду или другую среду для предварительного неселективного обогащения нагревают в водяной бане до температуры $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Подготовленную пептонно-буферную среду или другую среду для предварительного неселективного обогащения инокулируют при комнатной температуре навеской продукта массой $(25 \pm 0,1)$ г. Соотношение между количеством высеваемого продукта и количеством неселективной среды 1:10:

($25 \pm 0,1$) г пробы на ($225,0 \pm 0,1$) см³ среды. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (18 ± 2) ч.

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

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

8.2 Селективное обогащение

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

Для этого 0,1 см³ культуры, полученной по 8.1.2, пересевают в ($10,0 \pm 0,1$) см³ среды Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) (см. 7.4.6) и 1,0 см³ культуры, полученной по 8.1.2, пересевают в ($10,0 \pm 0,1$) см³ в одну из сред: тетратионатный бульон (Мюллер-Кауфмана) (см. 7.4.3), селенитовую обогатительную (см. 7.4.2), селенит-цистиновый накопительный бульон (см. 7.4.4), магниевую (см. 7.4.5), модифицированную полужидкую среду MSRV (см. 7.4.7) или другую среду для селективного обогащения (см. 7.4.36).

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

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

При посеве на модифицированную полужидкую среду MSRV 0,1 см³ культуры из среды для предварительного неселективного обогащения пересевают на поверхность MSRV среды. Для большей селективности допускается распределить посевную дозу (0,1 см³) на три точки внесения по центру чашки Петри. Посевы, на модифицированной полужидкой среде MSRV инкубируют в течение (24 ± 3) ч при температуре ($41,5 \pm 1,0$) °С. Чашки Петри не переворачивают. При отсутствии роста через (24 ± 3) ч посевы дополнительно инкубируют в течение (24 ± 3) ч. Для подвижных штаммов сальмонелл характерен диффузный рост в толще этой среды от центра к периферии.

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

8.2.3 Прямой посев в среды для селективного обогащения

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

Соотношение между количеством высеваемого продукта и количеством селективной среды 1:10: ($25,0 \pm 0,1$) г пробы на ($225,0 \pm 0,1$) см³ среды. В случае объединения навески продукта — по 8.1.3.

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

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

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

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

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

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

Бактерии рода *Salmonella* образуют:

- на XLD-агаре:

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

колонии розовые с темным розовым центром (H_2S — отрицательные бактерии рода *Salmonella*, например *S. paratyphi A*, колонии желтые с почернением или без него (лактозоположительные бактерии рода *Salmonella*); - на среде Эндо — колонии бесцветные или слегка розоватые; - на среде Плоскирева — колонии бесцветные прозрачные, но более плотные, чем на среде Эндо; - на висмут-сульфите агаре: колонии черные с характерным металлическим блеском (например, *S. typhi*) с пигментированием среды под колониями, колонии зеленоватые с темно-зеленым ободком или бесцветные без пигментирования среды под колониями; - на среде Левина — колонии прозрачные, слабо-розовые или розово-фиолетовые; - на бриллиантовом зеленом агаре: колонии красноватые или розовые, почти белые (их цвет зависит от штамма и срока инкубирования), колонии зеленоватые, окруженные яркой желто-зеленой зоной (лактозоположительные и сахарозоположительные штаммы).

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

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

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

8.4 Идентификация бактерий рода *Salmonella*

Для идентификации бактерий рода *Salmonella* допускается использование наборов тест-систем (см. 7.3.12) промышленного производства, разрешенных и зарегистрированных в Российской Федерации. Идентификация с использованием наборов тест-систем для идентификации микроорганизмов основана на использовании стандартных биохимических микротестов. Системы используют по инструкции производителя со специальной адаптированной под микротесты базой данных (см. 7.3.12).

Для подтверждения идентификации бактерий рода *Salmonella* допускается использование латекс-тестов [7].

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

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

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

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

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

Чашки Петри или пробирки с посевами инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

8.4.2 Окраска по Граму

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

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

8.4.3 Определение биохимических свойств культуры

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

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

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

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

Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч, после чего просматривают.

8.4.3.1 Определение ферментации сахаров

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

Интерпретация результатов по изменениям среды

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

- малиновый цвет скошенной поверхности среды указывает на ферментацию лактозы.

Среда Олькеницкого:

- пожелтение самого столбика среды указывает на ферментацию глюкозы (глюкоза положительная);

- пожелтение скошенной поверхности среды указывает на ферментацию лактозы и/или сахарозы (лактоза и/или сахароза положительная);

- красный или неизменившийся столбик среды указывает на отсутствие ферментации глюкозы (глюкоза отрицательная);

- красная или неизменившаяся скошенная поверхность среды указывает на отсутствие ферментации лактозы и/или сахарозы (лактоза и/или сахароза отрицательная);

- пузырьки или разрывы в толще среды указывают на образование газа из глюкозы;

- черный цвет среды указывает на образование сероводорода.

TSI-агар:

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

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

Определение ферментации маннита и сахарозы

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

При ферментации маннита цвет среды изменяется.

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

Определение ферментации сахаров с помощью дисков с углеводами

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

8.4.3.2 Определение образования сероводорода

Для определения образования сероводорода используют одну из питательных сред: Олькеницкого (см. 7.4.25) или среду Клиглера (см. 7.4.22), или 1 %-ную пептонную воду (см. 7.4.33). Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение от 24 до 72 ч.

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

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

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

8.4.3.4 Определение расщепления мочевины

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

Культуры засевают штрихом по поверхности скошенной среды в пробирках. Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч, периодически наблюдая за посевами (для уреазоположительных бактерий реакция часто становится видимой уже после 2 ч инкубирования).

Агар Кристенсена

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

Отсутствие изменения окраски — отрицательная реакция.

Агар тройной сахарный

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

Отсутствие изменения окраски — отрицательная реакция.

Бактерии рода *Salmonella* мочевину не расщепляют.

8.4.3.5 Определение образования индола

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

Пептонная вода

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

С реактивом Эрлиха при наличии индола не позднее чем через 5 мин в пограничном слое образуется ярко-красное кольцо — положительная реакция. Кольцо остается светло-желтого цвета — отрицательная реакция.

С реактивом Ковача результаты учитывают через 10 мин после взбалтывания. Реактив поднимается на поверхность среды и при наличии индола окрашивается в темно-красный цвет — положительная реакция.

Бульон Хоттингера, триптон-триптофановая среда

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

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

Бактерии рода *Salmonella* индола не образуют.

8.4.3.6 Определение образования ацетоина (реакция Фогес-Проксауера)

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

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

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

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

8.4.3.7 Определение образования L-лизиндекарбоксилазы

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

Жидкую L-лизиндекарбоксилазную среду инокулируют снизу бактериальной культурой и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

Помутнение и пурпурный цвет среды после инкубирования — положительная реакция.

Желтый цвет среды — отрицательная реакция.

Столбик агаризованной среды с одной из аминокислот инокулируют бактериальной культурой методом укола и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

Темно-красная окраска среды — положительная реакция.

Желтый цвет среды — отрицательная реакция.

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

8.4.3.8 Определение β -галактозидазной активности

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

Желтый цвет супензии — положительная реакция.

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

Бактерии рода *Salmonella*, кроме *Salmonella arizona*, не обладают β -галактозидазой.

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

8.4.3.9 Интерпретация результатов биохимических испытаний

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

8.4.4 Определение подвижности

Для определения подвижности культуру высевают методом укола в пробирку со столбиком полужидкого питательного агара (см. 7.4.30). Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

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

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

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

8.4.5 Серологическая идентификация — по ГОСТ Р 52814 (пункт 8.5.4).

8.4.6 Интерпретация результатов испытаний выявленных культур на биохимические свойства и серологические реакции — по ГОСТ Р 52814 (пункт 8.5.5).

9 Обработка результатов исследований

9.1 Результаты исследований оценивают по каждой пробе в отдельности.

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

10 Контроль проведения исследований

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

Библиография

- [1] СП 1.3.2322—2008 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней
- [2] СП 1.2.036—95 Санитарные правила. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмами III—IV групп патогенности
- [3] МУ 2.1.4.1057—2001 Методические указания. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды
- [4] МУ 11-3/12-09—2003 Методические указания по применению медицинских упаковочных материалов корпорации «СПС/Рексам, Франция»
- [5] МУ 24-92—1992 Министерство медицинской промышленности. Контроль стерильности материалов первичной упаковки
- [6] МР № 02.014—2006 Методические рекомендации. Серотипирование бактерий рода *Salmonella* методом латексной агглютинации, утверждены Главным врачом ФГУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора 08.12.2001
- [7] Набор для подтверждения идентификации *Salmonella* с помощью латекс-теста HiSalmonella™ФС № 2006/2514—2006
- [8] МР № 24ФЦ/976—2004 AOAC, BAM, ISO, SMWW, USP Методические рекомендации. Селенит-цистиновый накопительный бульон — Selenite cystine enrichment broth for the enrichment of *salmonellae*
- [9] МР 24ФЦ/976—2004 Методические рекомендации. USDA XLT-4 agar (Base) for microbiology МР № 24ФЦ/976, USDA
- [10] МР № 24ФЦ/976—2004 BAM. Методические рекомендации. Среда SIM для идентификации (сероводород, индол, подвижность) — SIM medium for microbiology
- [11] МУК 4.2.2316—2008 Методы контроля бактериологических питательных сред

УДК 663.664.001.4:006.354

ОКС 67.120.20

Н19

ОКСТУ 9209

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

Редактор *М.И. Максимова*

Технический редактор *В.Н. Прусакова*

Корректор *В.И. Варенцова*

Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Подписано в печать 23.12.2011. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.

Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 90 экз. Зак. 10.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.

Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.