

**ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ**

**Методы выявления и определения бактерий**

***Listeria monocytogenes***

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом мясной промышленности им. В.М. Горбатова РАСХН (головная организация); Государственным учреждением Научно-исследовательским институтом питания РАМН; Государственным учреждением Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН; Государственным унитарным предприятием Государственным научно-исследовательским и проектно-конструкторским институтом по развитию и эксплуатации флота; Государственным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН

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

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 12 июля 2002 г. № 277-ст

3 Настоящий стандарт гармонизирован с международным стандартом ИСО 11290-2—98 «Микробиология продуктов питания и животных кормов. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета микроорганизмов *Listeria monocytogenes*. Часть 2. Метод подсчета» в части 9.1—9.3, 9.4.1—9.4.4, 9.5.1 — 9.5.3, В.4, В.5

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ

## ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

## Методы выявления и определения бактерий

*Listeria monocytogenes*

Food products. Methods for detection and determination of  
*Listeria monocytogenes* bacteria

Дата введения 2003—07—01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, в том числе на продукты детского, лечебного и специализированного питания: мясо, включая мясо птицы, субпродукты и мясные продукты; рыбу, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них; молоко и молочные продукты; маргарин, майонез, свежие и свежемороженые овощи, картофель, салаты из овощей и устанавливает метод выявления и определения в них бактерий вида *Listeria monocytogenes*.

Метод основан на высеве определенного количества пищевого продукта в жидкую селективную питательную среду (с предварительным обогащением), последующем пересеве на агаризованные селективно-диагностические среды и культивировании посевов при оптимальных условиях. Принадлежность выявленных колоний к *Listeria monocytogenes* определяют по биологическим свойствам.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ 976—81\* Маргарин, жиры для кулинарии, кондитерской и хлебопекарной промышленности. Правила приемки и методы испытаний
- ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия
- ГОСТ 4288—76 Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса. Правила приемки и методы испытаний
- ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия
- ГОСТ 7631—85 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний
- ГОСТ 7702.2.0—95/ГОСТ Р 50396.0—92 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим испытаниям
- ГОСТ 9225—84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа
- ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия
- ГОСТ 9792—73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб
- ГОСТ 9958—81 Изделия колбасные и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа
- ГОСТ 10444.1—84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе
- ГОСТ 10444.8—88 Продукты пищевые. Метод определения *Vacillus cereus*
- ГОСТ 13928—84 Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

\* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52179—2003.

## ГОСТ Р 51921—2002

- ГОСТ 21237—75 Мясо. Методы бактериологического анализа  
ГОСТ 25706—83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования  
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 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу  
ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.  
ГОСТ 30004.2—93 Майонезы. Правила приемки и методы испытаний  
ГОСТ 30425—97 Консервы. Метод определения промышленной стерильности  
ГОСТ 30519—97/ГОСТ Р 50480—93 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*  
ГОСТ Р 51447—99 (ИСО 3100-1—91) Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб  
ГОСТ Р 51448—99 (ИСО 3100-2—88) Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований  
СП 1.2.731—99 Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами

### 3 Определения и сокращения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями и сокращениями:

**бактерии рода *Listeria*** (далее — листерии): Грамположительные неспорообразующие короткие палочки с закругленными концами, иногда почти кокки, одиночные или в коротких цепочках (0,4—0,5×0,5—2,0 мкм), реже образуют длинные нити.

***Listeria monocytogenes***: Вид бактерий рода *Listeria*, патогенный для человека и животных, принадлежность к которому устанавливают путем дифференциации от непатогенных видов *Listeria* по культуральным, биохимическим и биологическим свойствам.

МПА — мясопептонный агар.

МПБ — мясопептонный бульон.

ПБЛ — питательный бульон для выделения и культивирования листерий.

ПАЛ — питательный агар для выделения листерий.

### 4 Аппаратура, материалы и реактивы

4.1 Аппаратура, материалы и реактивы — по ГОСТ 10444.1 со следующими дополнениями: анализатор иммуно-ферментный типа «mini VIDAS» с использованием стрипового набора VIDAS LMO;

дозаторы пипеточные по [1];

лупа по ГОСТ 25706;

микроскоп биологический с иммерсионной системой и увеличением 900<sup>x</sup>;

pH-метр модели 2696 по [2];

петля бактериологическая из платины/иридия, никеля, хрома или пластиковая диаметром 3 мм;

пипетки градуированные по ГОСТ 29227, второго класса точности;

пипетки пастеровские;

слайды или планшеты для иммунологических реакций по [3];

стекла покровные по ГОСТ 6672;

стекла предметные по ГОСТ 9284;

термометр цифровой по [4];

часы механические сигнальные по ГОСТ 3145;

бактериофаг листерийный L-3A по [5];

гидролизат казеина панкреатический;

диагностикум антительный латексный для выявления листерий «Листерия-AG-тест» по [6];

манноза;  
 система «API Listeria» для определения ферментативных свойств по [7];  
 стандарт мутности Макфарланда, соответствующий 1 ЕД;  
 сыворотка поливалентная листериозная агглютинирующая по [8];  
 тест-штамм *Listeria monocytogenes* 766;  
 тест-штамм *Rhodococcus equi* гемолитический;  
 тест-штамм *Staphylococcus aureus* гемолитический.

## 5 Отбор и подготовка проб

5.1 Отбор и подготовку проб пищевых продуктов проводят в соответствии с ГОСТ 26668, ГОСТ 26669, а также в соответствии с нормативными и техническими документами на конкретные виды продуктов.

Масса или объем навески должны составлять  $(25 \pm 0,1)$  г ( $\text{см}^3$ ), (50 — 100 г или 50 — 100  $\text{см}^3$  — для продуктов детского, лечебного и специализированного питания).

5.2 Отбор и подготовку проб мяса, включая мясо птицы, субпродуктов, мясных полуфабрикатов, колбасных изделий и других мясных продуктов, в том числе продуктов детского, лечебного и специализированного питания, проводят по 5.1 и ГОСТ 4288 (1.3, 2.1, 2.11.3), ГОСТ 7702.2.0/ГОСТ Р 50396.0, ГОСТ 9792, ГОСТ 9958 (3.33), ГОСТ 21237 (1.1—1.3, 3.3), ГОСТ Р 51447, ГОСТ Р 51448.

5.3 Отбор и подготовку проб молока и молочных продуктов, в том числе продуктов детского, лечебного и специализированного питания, проводят по 5.1 и ГОСТ 9225 (1.1 — 1.7), ГОСТ 13928, ГОСТ 26809, [9].

5.4 Отбор и подготовку проб маргарина и майонеза проводят по 5.1 и ГОСТ 976 (2.1), ГОСТ 30004.2 (1.2, 2.1), [10].

5.5 Отбор и подготовку проб рыбы, нерыбных объектов промысла и продуктов, вырабатываемых из них, в том числе продуктов детского, лечебного и специализированного питания проводят по 5.1 и ГОСТ 7631 (1.3, 4.1 — 4.3), [11] и [12].

5.6 Отбор и подготовку проб плодоовощной продукции, в том числе продуктов детского, лечебного и специализированного питания, проводят по 5.1 и [13].

## 6 Подготовка к исследованию

### 6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Пептонно-солевой раствор для приготовления разведений — по ГОСТ 26669 (1.2).

6.1.2 Растворы и реактивы для окраски по Граму — по ГОСТ 10444.1 (4.25).

6.1.3 Физиологический раствор — по ГОСТ 10444.1 (4.29).

6.1.4 Раствор с объемной долей перекиси водорода 3 % — по ГОСТ 10444.1 (4.33).

6.1.5 Приготовление растворов для постановки реакции нитратредукции.

Раствор А готовят по ГОСТ 10444.8 (3.1.7).

Раствор Б готовят по ГОСТ 10444.8 (3.1.6).

Непосредственно перед постановкой реакции растворы А и Б смешивают.

### 6.2 Приготовление питательных сред

6.2.1 Среды для поддержания выделенных культур и культивирования бактерий рода *Listeria*

6.2.1.1 МПБ с 1 % глюкозы — по ГОСТ 10444.1 (5.13).

6.2.1.2 МПА с 1 % глюкозы — по ГОСТ 10444.1 (5.13).

6.2.1.3 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) — по [14].

6.2.1.4 Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) — по [14].

6.2.1.5 Трипказо-соевый бульон (TSB) — по [15].

6.2.1.6 Трипказо-соевый агар (TSA) — по [15].

6.2.1.7 Состав питательных сред и способы приготовления приведены в приложении А.1.1 — А.1.4.

6.2.2 Среды селективные для предварительного обогащения

6.2.2.1 ПБЛ I — по [16].

6.2.2.2 Бульон Фразера полуконцентрированный (Half Fraser broth) — по [14], [15].

6.2.2.3 Состав питательных сред и способы приготовления приведены в приложении А (А.2.1, А.2.2).

6.2.3 Среды селективные для обогащения

6.2.3.1 ПБЛ II — по [16].

6.2.3.2 Бульон Фразера (Fraser broth)— по [14], [15].

6.2.3.3 Состав питательных сред и способы приготовления приведены в приложении А (А.3.1, А.3.2).

6.2.4 Среды селективно-диагностические

6.2.4.1 Среда ПАЛ — по [18].

6.2.4.2 Оксфордский агар (Oxford agar) — по [14], [15].

6.2.4.3 ПАЛКАМ агар (PALCAM agar) — по [14], [15], [17].

6.2.4.4 Состав питательных сред и способы приготовления приведены в приложении А (А.4.1 — А.4.3).

6.2.5 Среды для изучения биологических свойств при идентификации листерий

6.2.5.1 Питательная среда ГРМ № 1 — по [19].

6.2.5.2 Кровяной агар

К 100 см<sup>3</sup> растопленного и охлажденного до 45 °С— 50 °С МПА с 1 % глюкозы добавляют 5 — 10 см<sup>3</sup> стерильно взятой дефибринированной крови животных. Смесь осторожно перемешивают и разливают в чашки Петри (не более 10 см<sup>3</sup> на чашку). Слой агара должен быть равномерно окрашен в красный цвет. Среду подсушивают при (37 ± 1) °С в соответствии с ГОСТ 26670 (4.2.1) и хранят не более 2 сут при температуре (4 ± 1) °С. Среда должна иметь рН 7,2 — 7,4.

Для посева используют теплые чашки.

6.2.5.3 Лецитин-агар с активированным углем и без угля

К питательной среде ГРМ № 1 перед стерилизацией добавляют 0,5 % активированного угля, растертого до порошкообразного состояния.

Желток куриного яйца разводят с соблюдением правил асептики в 150 см<sup>3</sup> физиологического раствора и добавляют в количестве 5 % по объему к стерилизованной и охлажденной до 40 °С— 45 °С питательной среде. Разливают в чашки Петри не более 20 см<sup>3</sup> на чашку и подсушивают при (37 ± 1) °С.

Аналогично готовят агар с добавлением желтка без добавления активированного угля.

6.2.5.4 Нитратную среду готовят по ГОСТ 10444.8 (3.2.9).

6.2.5.5 Полужидкую питательную среду (*Listeria motility medium*) для определения подвижности листерий готовят в соответствии с приложением А.5.1.

6.2.5.6 Среды Гисса готовят по ГОСТ 10444.1 (5.29), используя в качестве углевода рамнозу, ксилозу, маннозу и маннит.

6.2.5.7 МПБ с 0,5 % глюкозы готовят по ГОСТ 10444.1 (5.13), но при приготовлении добавляют 5 г глюкозы.

6.2.5.8 МПА готовят по ГОСТ 10444.1 (5.12).

6.3 Среды по 6.2.2, 6.2.3, 6.2.4 готовят накануне или непосредственно перед использованием в соответствии с указанием на этикетке.

Готовые среды хранят в темноте, так как отдельные компоненты, входящие в их состав, например акрифлавин, могут окисляться на свету, образуя продукты, подавляющие рост листерий.

## 7 Проведение исследования

### 7.1 Предварительное селективное обогащение

Навеску пищевого продукта массой (25 ± 0,1) г или объемом (25 ± 0,1) см<sup>3</sup> по 5.1 вносят в 225 см<sup>3</sup> одной из жидких сред для предварительного обогащения, приготовленных по 6.2.2. Содержимое встряхивают 25-кратными круговыми движениями радиусом 30 см.

Массу навески продуктов детского, лечебного или специализированного питания отбирают по 5.1. Соотношение между количеством высеваемого продукта и питательной средой должно составлять 1:9.

Посевы культивируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

При росте листерий на полуконцентрированном бульоне Фразера, содержащем эскулин, отмечают почернение среды за счет гидролиза гликозида эскулина до глюкозы и эскулетина. Эскулетин реагирует с ионами железа, образуя комплекс черного или оливкового цвета.

На ПБЛ I, не содержащем эскулин, почернение не происходит.

### 7.2 Селективное обогащение

После инкубирования продукта по 7.1 содержимое среды, независимо от наличия в ней

изменений, в количестве 0,1 см<sup>3</sup> пересевают в 10 см<sup>3</sup> одной из жидких сред обогащения. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

На бульоне Фразера, содержащем эскулин, отмечают почернение среды, как признак возможного присутствия листерий.

На среде ПБЛ II почернение не происходит.

### **7.3 Выявление характерных колоний на агаризованных селективно-диагностических средах**

7.3.1 Из пробирок после инкубирования по 7.2, независимо от наличия или отсутствия признаков роста, в том числе почернения, делают посев бактериологической петлей из культуральной жидкости на поверхность одной из агаризованных селективно-диагностических сред, указанных в 6.2.4. Допускается проводить пересев параллельно на поверхность двух плотных селективно-диагностических сред.

Посевной материал растирают по поверхности шпателем или распределяют петлей в виде штриха. Подготовку чашек Петри со средой к посеву и посев проводят по ГОСТ 26670.

Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 24—48 ч.

7.3.2 После инкубирования по 7.3.1 чашки с посевами просматривают и отмечают рост характерных колоний.

При отсутствии роста характерных колоний листерий на селективно-диагностических средах, указанных в 6.2.4, исследование прекращают и делают заключение об отсутствии *Listeria monocytogenes* в исследуемой пробе продукта.

На среде ПАЛ рост листерий сопровождается потреблением эскулина и почернением колоний и питательной среды. Через 24 ч инкубирования они образуют мелкие серовато-желтые колонии с черным ореолом диаметром от 1,0 до 2,0 мм. Посторонняя кокковая микрофлора образует выпуклые колонии лимонно-желтого цвета диаметром от 1,0 до 4,0 мм, окруженные слабым (или без него) покраснением питательной среды.

На ПАЛКАМ агаре (PALCAM agar) через 24 ч инкубирования листерии формируют мелкие серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом диаметром от 1,0 до 1,5 мм, иногда с черным центром. Через 48 ч колонии диаметром 1,5—2,0 мм приобретают зеленую окраску с углубленными центрами, окруженными черным ореолом. Посторонняя кокковая микрофлора образует выпуклые желтые колонии диаметром от 1,0 до 4,0 мм.

На Оксфордском агаре колонии листерий через 24 ч инкубирования — мелкие диаметром 1 мм сероватые, окруженные черным ореолом. Через 48 ч — более темные около 2 мм в диаметре с черным ореолом и углубленным центром.

При появлении сплошного роста листерий проводят пересев бактериологической петлей из зон наибольшего почернения среды штрихами на поверхность двух чашек Петри с одной из агаризованных селективно-диагностических сред, указанных в 6.2.4, для получения изолированных колоний.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 — 48 ч.

7.3.3 Для определения принадлежности характерных колоний к бактериям рода *Listeria* отбирают отдельных колоний, выращенных на агаризованных селективно-диагностических средах по 7.3.1, и пересевают бактериологической петлей на среды: МПА с 1 % глюкозы и/или триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA), трипказо-соевый агар (TSA), МПБ с 1 % глюкозы и/или триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB), трипказо-соевый бульон (TSB).

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

Получение чистой культуры проводят по ГОСТ 26670.

На МПА с 1 % глюкозы листерии имеют вид мелких сероватых полупрозрачных колоний.

На триптон-соевом агаре с дрожжевым экстрактом (TSYEA) и трипказо-соевом агаре (TSA) типичные колонии листерий от 1,0 до 2,0 мм в диаметре, выпуклые, бесцветные, непрозрачные.

На всех указанных средах вид колоний напоминает «капли росы».

Рост листерий на средах: МПБ с 1 % глюкозы, триптон-соевом бульоне с дрожжевым экстрактом (TSYEB), трипказо-соевом бульоне (TSB) характеризуется равномерным помутнением среды, при встряхивании которой наблюдаются так называемые муаровые волны.

### **7.4 Подтверждение принадлежности выявленных колоний к бактериям рода *Listeria***

Для подтверждения принадлежности выделенных микроорганизмов к роду *Listeria* у полученных на средах культивирования чистых культур по 7.3.3 проверяют отсутствие капсул и спор, окраску по Граму, определяют присутствие каталазы (каталазную активность), подвижность бактерий при двух температурах инкубирования: (22 ± 1) °С и (37 ± 1) °С, нитратредуцирующие свойства.

7.4.1 Из посевов по 7.3.3 готовят препараты, окрашивают их по Граму по ГОСТ 30425 (прило-

жение Г.2) и микроскопируют. Бактерии рода *Listeria* являются грамположительными тонкими короткими палочками, спор и капсул не образуют.

7.4.2 Каталазную активность культур определяют в соответствии с ГОСТ 30425 (приложение Г.1) по способности каталазы разлагать перекись водорода с выделением пузырьков газа.

Бактерии рода *Listeria* являются каталазоположительными.

7.4.3 Подвижность культур определяют при посеве уколом в среду, приготовленную по 6.2.5.5. Посевы инкубируют при двух температурах:  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 48 ч.

Бактерии рода *Listeria* подвижны при  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ , образуют характерный рост вокруг линии укола, похожий на зонтик, и неподвижны или слабоподвижны при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

7.4.4 Постановку реакции нитратредукции проводят по ГОСТ 10444.8 (4.2.5).

Бактерии рода *Listeria* не восстанавливают нитраты до нитритов (за исключением непатогенной *Listeria grayi*).

7.4.5 Обнаружение в посевах грамположительных коротких тонких палочек, каталазоположительных, не восстанавливающих нитраты до нитритов, подвижных при  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$  и неподвижных или слабоподвижных при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , указывает на принадлежность выделенных микроорганизмов к бактериям рода *Listeria*.

### 7.5 Подтверждение принадлежности выявленных колоний к виду *Listeria monocytogenes*

Дифференциацию выделенных культур проводят в два этапа: сначала определяют принадлежность выделенных микроорганизмов к бактериям рода *Listeria*, а затем подтверждают их принадлежность к виду *Listeria monocytogenes*.

Определение принадлежности выделенных микроорганизмов к бактериям рода *Listeria* проводят по 7.4.

Для подтверждения принадлежности выделенных бактерий рода *Listeria* к виду *Listeria monocytogenes* у выделенных микроорганизмов определяют ферментативные свойства (способность ферментировать углеводы на средах Гисса с применением маннита, ксилозы, маннозы и рамнозы),  $\beta$ -гемолитическую активность (способность образовывать зоны просветления за счет растворения эритроцитов под или вокруг колоний при посеве на поверхность кровяного агара), лецитиназную активность на средах с активированным углем и без угля, а также дополнительно проводят идентификацию *Listeria monocytogenes* путем постановки реакции агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой или антительным латексным диагностикумом «Листерия—AG-тест».

Допускается для быстрого определения ферментативных свойств *Listeria monocytogenes* применять систему биохимической идентификации «API *Listeria*».

Допускается ускоренная идентификация *Listeria monocytogenes* с применением анализатора типа «mini VIDAS», а также дополнительное использование листерийного бактериофага L-3A для идентификации.

#### 7.5.1 Определение ферментативных свойств *Listeria monocytogenes*

7.5.1.1 Культуры, полученные по 7.3.3, пересевают уколом в среды Гисса по 6.2.5.6. Посевы инкубируют до 7 сут при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , ежедневно проверяя кислото- и газообразование. Наличие ферментативной активности в отношении углеводов определяют по изменению окраски сред за счет образования кислоты и/или газа. При появлении этих признаков проводят учет результатов. Большинство бактерий рода *Listeria* не ферментируют маннит (за исключением *Listeria grayi*).

*Listeria monocytogenes* ферментируют маннозу и рамнозу с образованием кислоты и не ферментируют маннит и ксилозу (таблица 1).

Т а б л и ц а 1 — Характеристика видов бактерий рода *Listeria*

Признак	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. welshimeri</i>
Ферментация:						
маннита	—	—	—	—	+	—
ксилозы	—	+	+	—	—	+
маннозы	+	+	+	—	+	—
рамнозы	+	—	—	±	+	±
$\beta$ -гемолиз	+	+	+	—	—	—

Окончание таблицы 1



Признак	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. welshimeri</i>
КАМП-тест.	+	+	+	—	—	—
Усиление гемолиза около культур:						
Rh. equi	—	+	—	—	—	—
St. aureus	+	—	+	—	—	—
Гидролиз лецитина:						
без угля	—	+	—	—	—	—
с углем	+	+	—	—	—	—

7.5.1.2 Определение ферментативных свойств *Listeria monocytogenes* с помощью системы биохимической идентификации «API Listeria».

При этом бактериологической петлей выделяют изолированную колонию листерий, выращенную на Оксфордском агаре или ПАЛКАМ агаре (PALCAM agar) в соответствии с 7.3.2, и вносят в пробирку с 2 см<sup>3</sup> дистиллированной воды для приготовления суспензии по стандарту мутности, эквивалентной 1 ЕД по шкале Макфарланда.

Приготовленную суспензию вносят пастеровской пипеткой по 0,05 см<sup>3</sup> в лунки полоски системы «API Listeria», содержащие: ESC (эскулин),  $\alpha$ -MAN (маннит), DARL (D-арабитол), XYL (ксилоза), RHA (рамноза), MDG ( $\alpha$ -метил-D-глюкоза), RIB (рибоза), G1P (глюкоза-1-фосфат) и TAG (D-тагатоза), избегая образования пузырьков газа. Параллельно вносят пастеровской пипеткой 0,1 см<sup>3</sup> суспензии в лунку DIM полоски набора системы «API Listeria» для идентификации *Listeria monocytogenes* от *Listeria innocua*.

Полоски набора, на которые нанесена суспензия, инкубируют при температуре 35 °С—37 °С в аэробных условиях в течение 18—24 ч и визуально учитывают результаты цветообразования по степени окраски суспензии путем сравнения с данными таблицы 2.

Заключение о наличии *Listeria monocytogenes* делают на основании сравнения изменений цветообразования в лунках полоски системы «API Listeria» с данными таблицы 2 в разделе позитивной оценки.

Т а б л и ц а 2 — Характеристика *Listeria monocytogenes* по изменению цветообразования в лунках системы «API Listeria»

Тесты	Реакция	Оценка цветообразования	
		негативная	позитивная
DIM	Дифференциация <i>L.monocytogenes</i> от <i>L.innocua</i>	Бледно-оранжевый, бежево-розовый, бежево-серый	Оранжевый
ESC	Гидролиз	Бледно-желтый	Черный
$\alpha$ -MAN	Гидролиз	Бесцветный	Желтый
DARL	Кислотообразование	Красный	Желтый
XYL	Кислотообразование		
RHA	Кислотообразование		
MDG	Кислотообразование		
RIB	Кислотообразование	Красно-оранжевый	Желто-оранжевый
G1P	Кислотообразование		
TAG	Кислотообразование		

### 7.5.2 Определение $\beta$ -гемолитической активности

7.5.2.1 Для определения  $\beta$ -гемолитической активности выделяют изолированную колонию листерий, полученную по 7.3.3, и высевают бактериологической петлей на поверхность кровяного агара, приготовленного с добавлением стерильной дефибринированной крови животных по 6.2.5.2. Посевы инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 24 ч.

Чашки просматривают в проходящем свете и отмечают образование зон  $\beta$ -гемолиза.

*Listeria monocytogenes* обладает  $\beta$ -гемолитической активностью с образованием узких зон просветления среды под или вокруг колоний.

7.5.2.2 Допускается вспомогательно для подтверждения гемолитической активности использовать КАМП-тест (СAMP-test).

7.5.2.2.1 Двухсуточные культуры гемолитических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi* высевают на кровяной агар, как показано на рисунке 1. Между вертикальными линиями *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi*, как показано на рисунке 1, засевают параллельными линиями исследуемые культуры на расстоянии друг от друга не менее 1 см и от вертикальных линий — 0,5 см.

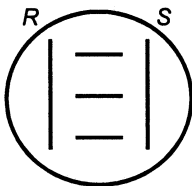
7.5.2.2.2 Желательно для контроля сделать посев тест-штамма *Listeria monocytogenes* 766 аналогично посеву исследуемых культур по 7.5.2.2.1.

7.5.2.2.3 Посевы инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Отмечают изменение (расширение и просветление) зоны гемолиза в зонах, соседствующих с вертикальными штрихами стафилококка и родококка.

*Listeria monocytogenes* дает положительную КАМП-реакцию (расширение и просветление зоны гемолиза) около штриха *Staphylococcus aureus* и отрицательную (отсутствие изменений зоны гемолиза) — около штриха *Rhodococcus equi*.

7.5.3 Определение лецитиназной активности

7.5.3.1 Дно чашек Петри делят на несколько секторов или квадратов и исследуемые культуры,



*R* и *S* — культуры *Rhodococcus equi* и *Staphylococcus aureus* соответственно; параллельные горизонтальные линии — исследуемые культуры

Рисунок 1 — Схема посева при постановке КАМП-теста

полученные по 7.3.3, высевают короткими штрихами по одной на сектор (квадрат). Засев каждой исследуемой культуры проводят параллельно на чашки, содержащие и не содержащие уголь.

Посевы инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 48 ч.

Чашки просматривают в проходящем свете и отмечают наличие (отсутствие) лецитиназной активности на чашках, содержащих и не содержащих активированный уголь.

*Listeria monocytogenes* дает плотную зону помутнения шириной 3,0 — 6,0 мм на питательной среде с активированным углем за счет гидролиза лецитина.

*Listeria monocytogenes* гидролизует лецитин только в присутствии активированного угля. На среде, не содержащей активированный уголь, *Listeria monocytogenes* не обладает лецитиназной активностью (таблица 1).

7.5.3.2 Желательно для контроля сделать посев тест-штамма *Listeria monocytogenes* 766 аналогично посеву исследуемых культур по 7.5.3.1.

7.5.4 Постановка реакции агглютинации для идентификации *Listeria monocytogenes*

Реакцию агглютинации для идентификации *Listeria monocytogenes* выполняют на стекле с помощью поливалентной листериозной агглютинирующей сыворотки, содержащей антитела 0-II, V, VI, VII, IX и H-AB.

Предназначенную для идентификации чистую культуру, выращенную в течение 24 ч в питательном бульоне по 7.3.3 при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , засевают бактериологической петлей частым штрихом в две пробирки с МПА с 1 % глюкозы и выдерживают в течение 24—30 ч при температуре  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$  в

темном месте. Культуру, выращенную на МПА с 1 % глюкозы, смывают небольшим количеством физиологического раствора, чтобы получить густую взвесь (10—15 млрд клеток в 1 см<sup>3</sup>).

Реакцию агглютинации ставят на чистых обезжиренных предметных стеклах.

На предметное стекло наносят две капли: каплю поливалентной сыворотки и каплю физиологического раствора. К обеим каплям добавляют по одной капле смыва культуры, выращенной на МПА с 1 % глюкозы. Смесь тщательно и быстро перемешивают бактериологической петлей или запаянным концом пастеровской пипетки, после чего стекло плавно покачивают круговыми движениями. Одновременно ставят контрольный опыт: на предметное стекло наносят каплю поливалентной сыворотки и добавляют к ней каплю физиологического раствора.

Учет результатов реакции агглютинации проводят в течение 3 мин, отмечая появление хлопьев в капле с сывороткой. Запоздалые реакции не учитывают.

Реакцию агглютинации считают положительной при появлении хлопьев в капле с поливалентной листериезной сывороткой и отрицательной реакцией — отсутствие хлопьев в контроле.

При наличии спонтанной агглютинации реакцию агглютинации ставят повторно по указанной выше методике, но при посеве на МПА с 1 % глюкозы в качестве посевного материала используют культуру, выращенную в МПБ с 1 % глюкозы в течение 24 ч при температуре (22 ± 1) °С, чтобы предотвратить повторную спонтанную агглютинацию.

7.5.5 Определение чувствительности *Listeria monocytogenes* к листерийному бактериофагу L-3А для идентификации.

Допускается дополнительное определение для идентификации *Listeria monocytogenes* по реакции чувствительности к листерийному бактериофагу L-3А.

Для определения используют агаровую культуру, выращенную по 7.3.3 при температуре (37 ± 1) °С в течение 16—18 ч, которую засевают в МПБ с 1 % глюкозы или МПБ с 0,5 % глюкозы. Количество посевного материала должно быть таким, чтобы после встряхивания в пробирке с бульоном образовалась легкая опалесценция. Культуры подрашивают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 4 ч. После этого бактериальную взвесь наносят газонем на поверхность подсушенного МПА в чашках Петри. При подсушивании чашки открывают и переворачивают вверх дном. Агар, разлитый накануне, подсушивают 20 — 30 мин при комнатной температуре, а разлитый в день исследования — 1—1,5 ч при температуре (37 ± 1) °С.

В одной чашке можно одновременно проводить анализ четырех культур. Для этого поверхность агара делят на четыре сектора. На каждый сектор наносят по 0,1 см<sup>3</sup> исследуемой культуры и равномерно распределяют отдельным шпателем по отмеченному участку поверхности плотной питательной среды. Чашки с засеянными культурами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 1,0—1,5 ч.

Перед применением листерийного бактериофага L-3А содержимое ампулы растворяют в пробирке, с МПБ, с 1 % глюкозы в объеме, указанном на этикетке ампулы, и переносят в пробирки с соблюдением правил асептики. Растворенный бактериофаг не пригоден к использованию при наличии осадка, хлопьев или помутнения.

Неиспользованный в день исследования растворенный бактериофаг хранят в холодильнике при температуре 2 °С—6 °С в течение 5—10 сут и применяют в дальнейшей работе после предварительной проверки на отсутствие бактериального загрязнения по [5].

Всю лабораторную посуду, в которой содержался бактериофаг, а также выбракованный бактериофаг и посеvy после их учета обезвреживают кипячением не менее 30 мин.

Для исследования литического действия бактериофага на культуру листерий с целью ее идентификации на газон испытуемой культуры пастеровской пипеткой или бактериологической петлей наносят по одной капле бактериофага и отдельно каплю стерильного МПБ (контроль).

Место нанесения каждой капли отмечают карандашом по стеклу с наружной стороны чашки. Расстояние между наносимыми каплями должно быть не менее 1 см. Чашки после нанесения бактериофага и бульона оставляют при комнатной температуре (22 ± 1) °С в затемненном месте.

Учет результатов проводят через 16—24 ч. Культуру признают *Listeria monocytogenes*, если в месте нанесения бактериофага образуется прозрачная зона лизиса или полусливной лизис (в виде губки). Допускается наличие единичных колоний или сплошного нежного роста вторичной культуры в зоне лизиса при интенсивном бактериальном росте на остальной поверхности агара. В месте нанесения капли стерильного бульона (контроль) зона лизиса должна отсутствовать.

7.5.6 Постановка реакции пассивной агглютинации для идентификации *Listeria monocytogenes* Дополнительно для идентификации культуры, выращенной по 7.3.3, допускается использовать

иммунодисперсный антительный латексный диагностикум «Листерия—АG-тест» на основе синтетических окрашенных, монодисперсных функциональных микросфер.

Принцип метода состоит в специфической иммуноагглютинации микросфер, сенсibilизированных листерийными антителами.

При постановке реакции пассивной агглютинации на слайдах учет реакции проводят в течение 3 мин при образовании в капле ярко выраженных хлопьев, свидетельствующих о положительном результате.

При постановке реакции пассивной агглютинации в лунках полистироловых планшетов учет результатов проводят визуально через 2—3 ч после постановки реакции. Положительным результатом наличия *Listeria monocytogenes* считают тот, если в лунке планшета агглютинат имеет форму «зонтика» или равномерно распределен на дне. Отрицательным считают результат, если агглютинат оседает на дне лунки в виде колечка диаметром 1,0—1,5 мм или пуговки. Полученные результаты сравнивают с контрольными образцами, включенными в набор.

Реакцию на слайдах и полистироловых планшетах учитывают при отрицательном результате с негативным контрольным образцом и при положительном результате с позитивным контрольным образцом, включенных в диагностикум «Листерия—АG-тест».

7.5.7 Идентификация *Listeria monocytogenes* с помощью иммуноферментного анализатора типа «mini VIDAS» и применением стрипового набора «VIDAS LMO».

Для ускоренной идентификации *Listeria monocytogenes* используют приборы иммуноферментного анализа (ИФА), в том числе типа «mini VIDAS», зарегистрированные и сертифицированные для применения в Российской Федерации как средства измерения.

Для проведения анализа 1,0 см<sup>3</sup> обогащенной культуры на полуконцентрированном или концентрированном бульоне Фразера по 6.2.2.2 или 6.2.3.2 помещают в чистую стерильную пробирку и прогревают при температуре (100 ± 1) °С в течение 10 мин. Полученный субстрат в количестве 0,5 см<sup>3</sup> добавляют в незапечатанную лунку стрипа VIDAS LMO. Стрип помещают в анализатор. Ввод данных производят в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Все этапы анализа выполняются прибором автоматически.

В случае выдачи анализатором результата «Positive» делают заключение о наличии в исследуемом образце патогенных листерий. Эти результаты должны быть подтверждены исследованиями, проведенными по разделу 7 настоящего стандарта. Результаты оформляют в соответствии с разделом 8.

## 8 Обработка результатов

Результат оценивают по каждой пробе отдельно.

В образце констатируют присутствие *Listeria monocytogenes*, если из среды накопления выделены короткие грамположительные палочки, каталазоположительные, подвижные при (22 ± 1) °С, неподвижные или слабоподвижные при (37 ± 1) °С, гидролизующие эскулин; ферментирующие с образованием кислоты рамнозу и маннозу, не сбраживающие маннит и ксилозу, обладающие лецитиназной активностью только в присутствии активированного угля и β-гемолитической активностью.

Результаты выявления *Listeria monocytogenes* в определенной навеске продукта записывают: «*Listeria monocytogenes* обнаружены в 25 г (см<sup>3</sup>) (в 50—100 г (см<sup>3</sup>) — для продуктов детского, лечебного и специализированного питания) продукта» или «*Listeria monocytogenes* не обнаружены в 25 г (см<sup>3</sup>) (в 50—100 г (см<sup>3</sup>) — для продуктов детского, лечебного и специализированного питания) продукта».

## 9 Требования безопасности

При исследованиях пищевых продуктов на наличие *Listeria monocytogenes* руководствуются СП 1.2.731 и правилами Минздрава СССР [20].

Акрифлавин, хлорид лития и циклогексими́д, введенные в состав микробиологических питательных сред, являются токсичными веществами. Не допускается их попадание на кожу и в глаза.

ПРИЛОЖЕНИЕ А  
(справочное)

**Состав питательных сред**

**А.1 Среды для поддержания выделенных культур и культивирования бактерий рода *Listeria***

**А.1.1 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB)\***

Состав среды на 1 дм<sup>3</sup>, г:

гидролизат казеина ферментативный . . . . .	17,0
папаиновый отвар соевой муки. . . . .	3,0
хлорид натрия. . . . .	5,0
дрожжевой экстракт . . . . .	6,0
гидрофосфат калия . . . . .	2,5
глюкоза . . . . .	2,5
рН . . . . .	7,3±0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН 7,3 ± 0,2 и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

**А.1.2 Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA)\***

Состав среды на 1 дм<sup>3</sup>, г:

гидролизат казеина ферментативный . . . . .	17,0
папаиновый отвар соевой муки. . . . .	3,0
хлорид натрия. . . . .	5,0
дрожжевой экстракт . . . . .	6,0
гидрофосфат калия . . . . .	2,5
глюкоза . . . . .	2,5
агар-агар . . . . .	15,0
рН . . . . .	7,3±0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН 7,3±0,2 и стерилизуют в автоклавах при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду разливают в чашки Петри и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

**А.1.3 Трипказо-соевый бульон (TSB)\*\***

Состав среды на 1 дм<sup>3</sup>, г:

био-трипказа . . . . .	17,0
био-сойаза . . . . .	3,0
хлорид натрия. . . . .	5,0
дигидрофосфат калия . . . . .	2,5
декстроза . . . . .	2,5
рН . . . . .	7,3±0,1

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН 7,3±0,1 и стерилизуют в автоклавах при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду хранят не более 4 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

\*По прописи фирмы «HiMedia Lab. Ltd.», Индия.

\*\*По прописи фирмы «BioMerieux.», Франция.

Допускается использовать трипказо-соевый бульон взамен триптон-соевого бульона с дрожжевым экстрактом по А.1.1.

#### А.1.4 Трипказо-соевый агар (TSA)\*

Состав среды на 1 дм<sup>3</sup>, г:

био-трипказа . . . . .	15,0
био-сойза . . . . .	5,0
хлорид натрия . . . . .	5,0
агар-агар . . . . .	5,0
рН . . . . .	7,3±0,1

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН 7,3±0,1 и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду разливают в чашки Петри и хранят не более 47 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Допускается использовать трипказо-соевый агар взамен триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом по А.1.2.

### А.2 Среды селективные для предварительного обогащения

#### А.2.1 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I)

Состав основы среды на 1 дм<sup>3</sup>, г:

гидролизат казеина ферментативный . . . . .	10,0
пептон ферментативный мясной . . . . .	15,0
гидролизат автолизированных дрожжей . . . . .	2,0
хлорид натрия . . . . .	3,5
хлорид лития . . . . .	3,0
рН . . . . .	7,0±0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН 7,0±0,2 и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Перед употреблением к 1 дм<sup>3</sup> основы среды с соблюдением правил асептики добавляют 4,44 см<sup>3</sup> раствора селективных компонентов. Раствор готовят следующим образом: 10 мг налидиксовой кислоты, 5 мг акрифлавина и 5 мг полимиксина В сульфата\*\* растворяют в 10 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора.

Приготовленную среду разливают в стерильные колбы по 225 см<sup>3</sup> и хранят не более 2 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

#### А.2.2 Полуконцентрированный бульон Фразера (Half Fraser broth)

А.2.2.1 Состав основы среды\*\*\* на 1 дм<sup>3</sup>, г:

гидролизат казеина ферментативный . . . . .	5,0
пептический отвар животной ткани . . . . .	5,0
дрожжевой экстракт . . . . .	5,0
хлорид натрия . . . . .	20,0
дигидрофосфат калия . . . . .	1,35
гидрофосфат натрия . . . . .	12,0
эскулин . . . . .	1,0
хлорид лития . . . . .	3,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
рН . . . . .	7,2±0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН 7,2±0,2 и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Перед употреблением к 1 дм<sup>3</sup> основы среды с соблюдением правил асептики добавляют селективные компоненты: 10 мг налидиксовой кислоты и 12,5 мг акрифлавина, растворенные в 10 см<sup>3</sup> стерильного раствора гидроксида натрия концентрации 0,2 г/дм<sup>3</sup>.

\*По прописи фирмы «BioMerieux», Франция.

\*\*Допускается применение других веществ, обладающих аналогичными ингибиторными свойствами.

\*\*\*По прописи фирмы «HiMedia Lab. Ltd.», Индия.

Приготовленную среду разливают в стерильные колбы (по 225 см<sup>3</sup>) и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 6 °С.

А.2.2.2 Состав среды (готовая форма, 225 см<sup>3</sup>)\* на 1 дм<sup>3</sup>, г:

пептон . . . . .	10,0
мясной экстракт . . . . .	5,0
дрожжевой экстракт . . . . .	5,0
хлорид натрия. . . . .	20,0
дигидрофосфат калия . . . . .	1,35
гидрофосфат натрия . . . . .	12,0
эскулин . . . . .	1,0
хлорид лития . . . . .	3,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
акрифлавин . . . . .	0,0125
налидиксовая кислота. . . . .	0,01
рН . . . . .	7,3±0,1

Среду хранят не более 6 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Допускается использовать полуконцентрированный бульон Фразера взамен ПБЛ I по А.2.1.

### А.3 Среды селективные для обогащения

А.3.1 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II)

Состав основы среды на 1 дм<sup>3</sup>, г:

гидролизат казеина ферментативный . . . . .	10,0
пептон . . . . .	15,0
гидролизат автолизированных дрожжей . . . . .	2,0
хлорид натрия. . . . .	3,5
хлорид лития . . . . .	3,0
рН . . . . .	7,0±0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН 7,0±0,2 и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Перед употреблением к 1 дм<sup>3</sup> основы среды с соблюдением правил асептики добавляют 4,44 см<sup>3</sup> раствора селективных компонентов. Раствор готовят следующим образом: 10 мг налидиксовой кислоты, 5 мг акрифлавина и 5 мг полимиксина В сульфата\*\* растворяют в 5 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора.

Приготовленную среду разливают в стерильные пробирки (по 10 см<sup>3</sup>) и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

А.3.2 Бульон Фразера (Fraser broth)

А.3.2.1 Состав основы среды\*\*\* на 1 дм<sup>3</sup>, г:

гидролизат казеина ферментативный . . . . .	5,0
пептический отвар животной ткани . . . . .	5,0
дрожжевой экстракт . . . . .	5,0
хлорид натрия. . . . .	20,0
дигидрофосфат калия . . . . .	1,35
гидрофосфат натрия . . . . .	12,0
эскулин . . . . .	1,0
хлорид лития . . . . .	3,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
рН . . . . .	7,2±0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН 7,2±0,2 и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Перед употреблением к 1 дм<sup>3</sup> основы среды с соблюдением правил асептики добавляют селективные

\*По прописи фирмы «BioMerieux», Франция.

\*\*Допускается применение других веществ, обладающих аналогичными ингибиторными свойствами.

\*\*\*По прописи фирмы «HiMedia Lab. Ltd.», Индия.

компоненты: 100 мг налидиксовой кислоты и 250 мг акрифлавина, растворенные в 10 см<sup>3</sup> стерильного раствора гидроксида натрия концентрации 0,2 г/дм<sup>3</sup>.

Приготовленную среду разливают в стерильные пробирки по 10 см<sup>3</sup> и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 6 °С.

А.3.2.2 Состав среды (готовая форма, 10 см<sup>3</sup>)\* на 1 дм<sup>3</sup>, г:

пептон . . . . .	10,0
мясной экстракт . . . . .	5,0
дрожжевой экстракт . . . . .	5,0
хлорид натрия . . . . .	20,0
буферная смесь . . . . .	13,35
эскулин . . . . .	1,0
хлорид лития . . . . .	3,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
акрифлавин . . . . .	0,025
налидиксовая кислота . . . . .	0,02
pH . . . . .	7,3±0,1

Среду хранят не более 6 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Допускается использовать бульон Фразера взамен ПБЛ II по А.3.1.

#### А.4 Среды селективно-диагностические

##### А.4.1 Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ)

Состав основы среды на 1 дм<sup>3</sup>, г:

гидролизат казеина панкреатический . . . . .	10,0
гидролизат рыбной муки панкреатический . . . . .	15,0
гидролизат автолизированных дрожжей . . . . .	2,0
хлорид натрия . . . . .	3,5
хлорид лития . . . . .	15,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
эскулин . . . . .	0,8
агар-агар . . . . .	13,0
pH . . . . .	7,0±0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают pH 7,0±0,2 и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

К 1 дм<sup>3</sup> стерильной расплавленной основы среды добавляют с соблюдением правил асептики 4,44 см<sup>3</sup> раствора селективных компонентов. Раствор готовят следующим образом: 0,02 г налидиксовой кислоты, 0,01 г полимиксина В сульфата\*\* и 0,01 г акрифлавина растворяют в 10 см<sup>3</sup> стерильной дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

Приготовленную питательную среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

##### А.4.2 Оксфордский агар (Oxford agar)

А.4.2.1 Состав основы среды\*\*\* на 1 дм<sup>3</sup>, г:

пептон . . . . .	23,0
крахмал кукурузный . . . . .	1,0
хлорид натрия . . . . .	5,0
эскулин . . . . .	1,0
хлорид лития . . . . .	15,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
агар-агар . . . . .	10,0
pH . . . . .	7,0±0,2

Компоненты растворяют при нагревании в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают

\*По прописи фирмы «BioMerieux», Франция.

\*\*Допускается применение других веществ, обладающих аналогичными ингибиторными свойствами.

\*\*\*По прописи фирмы «HiMedia Lab. Ltd.», Индия.



до полного растворения. Устанавливают рН  $7,0 \pm 0,2$  и стерилизуют в автоклаве при температуре  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

К  $1 \text{ дм}^3$  стерильной расплавленной основы среды добавляют с соблюдением правил асептики селективные компоненты: 0,005 г акрифлавина, 0,02 г колистина, 0,4 г циклогексимида, 0,01 г фосфомицина, 0,002 г цефотетана, растворенные в  $10 \text{ см}^3$  стерильной дистиллированной воды.

Приготовленную питательную среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше  $8^\circ\text{C}$ .

А.4.2.2 Состав среды (готовая форма)\* на  $1 \text{ дм}^3$ , г:

пептон . . . . .	23,0
крахмал . . . . .	1,0
хлорид натрия . . . . .	5,0
эскулин . . . . .	1,0
хлорид лития . . . . .	15,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
акрифлавин . . . . .	0,005
колистин . . . . .	0,02
циклогексимид . . . . .	0,4
цефотетан . . . . .	0,002
фосфомицин . . . . .	0,01
агар-агар . . . . .	10,0
рН . . . . .	$7,0 \pm 0,1$

Среду хранят не более 6 мес в защищенном от света месте при температуре не выше  $8^\circ\text{C}$ .

Допускается использовать Оксфордский агар взамен среды ПАЛ по А.4.1.

А.4.3 ПАЛКАМ агар (PALCAM agar)

А.4.3.1 Состав основы среды\*\* на  $1 \text{ дм}^3$ , г:

пептон . . . . .	23,0
крахмал . . . . .	1,0
хлорид натрия . . . . .	5,0
эскулин . . . . .	0,8
хлорид лития . . . . .	15,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
глюкоза . . . . .	0,5
маннит . . . . .	10,0
феноловый красный . . . . .	0,08
агар-агар . . . . .	13,0
рН . . . . .	$7,0 \pm 0,2$

Компоненты растворяют в  $1000 \text{ см}^3$  дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Устанавливают рН  $7,0 \pm 0,2$  и стерилизуют в автоклаве при температуре  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

К  $1 \text{ дм}^3$  стерильной расплавленной основы среды добавляют с соблюдением правил асептики селективные компоненты: 0,005 г акрифлавина, 0,01 г полимиксина В, 0,02 г цефтазида, растворенные в  $10 \text{ см}^3$  стерильной дистиллированной воды.

Приготовленную питательную среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше  $8^\circ\text{C}$ .

А.4.3.2 Состав среды (готовая форма)\* на  $1 \text{ дм}^3$ , г:

пептон . . . . .	23,0
дрожжевой экстракт . . . . .	3,0
крахмал . . . . .	1,0
хлорид натрия . . . . .	5,0
эскулин . . . . .	0,8
хлорид лития . . . . .	15,0
цитрат аммонийного железа . . . . .	0,5
декстроза . . . . .	0,5
маннит . . . . .	10,0

\*По прописи фирмы «BioMerieux», Франция.

\*\*По прописи фирмы «HiMedia Lab. Ltd.», Индия.

феноловый красный . . . . .	0,08
акрифлавин . . . . .	0,005
полимиксин В сульфат . . . . .	0,01
цефтазидин . . . . .	0,02
агар-агар . . . . .	10,0
pH . . . . .	7,2±0,1

Среду хранят не более 6 мес в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Допускается использовать ПАЛКАМ агар взамен среды ПАЛ по А.4.1.

#### **А.5 Среда для изучения биологических свойств при идентификации листерий**

А.5.1 Полужидкая питательная среда для определения подвижности листерий (*Listeria motility medium*)\*

Состав среды на 1 дм<sup>3</sup>, г:

гидролизат казеина ферментативный . . . . .	20,0
пептон . . . . .	6,1
хлорид натрия . . . . .	5,0
агар-агар . . . . .	3,5
pH . . . . .	7,3±0,2

Компоненты растворяют в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, кипятят до полного растворения среды и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Приготовленную среду хранят не более 22 сут в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

#### **А.6 Требования к микробиологическим питательным средам и биологическим препаратам**

Питательные среды и биологические препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной и технической документации, утвержденной в установленном порядке.

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь разрешение Министерства здравоохранения Российской Федерации на их применение, выданное на основании международных сертификатов качества ИСО 9000 или EN 29000.

---

\*По прописи фирмы «HiMedia Lab. Ltd.», Индия.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б  
(справочное)

## Библиография

- [1] ТУ 64-1-33-29—81 Дозаторы пипеточные
- [2] ТУ 4215-001-13245171—97 рН-метр модели 2696.М., ТОО «Замер», 1997
- [3] ТУ 64-2-375—86 Слайды и полистироловые планшеты. Технические условия
- [4] ТУ 4215-002-13245171—01 Термометр цифровой «Замер-1». М., ООО «Измерительная техника», 2001
- [5] ТУ 46-20-1457—83 Набор листерийных бактериофагов сухих для идентификации листерий и постановки реакции нарастания титра фага
- [6] ВФС 42-2988—97 Антительный латексный диагностикум для выделения листерий «Листерия-AG-тест». Минздрав РФ, 1997
- [7] Регистрационное удостоверение № 97/496 Комплекс средств для определения антибиотикочувствительности и идентификации микроорганизмов. Фирма «Биомерье» («BioMerieux»), Франция. Минздрав РФ/19.05.97
- [8] ТУ 46-21-1542—85 Набор сывороток для типизации листерий. Ставропольская биофабрика, 1985
- [9] МУК 4.2.577—96 Методы контроля, биологические и микробиологические факторы. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов. Методические указания
- [10] Инструкция по санитарно-бактериологическому контролю производства маргарина и майонеза на предприятиях маргариновой промышленности. Госагропром СССР, М., 21.11.88
- [11] Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных № 5319—81 от 22.02.91
- [12] Руководство по выявлению и определению патогенных листерий в свежей, охлажденной и мороженой рыбе. Госкомрыболовства РФ, 2000 г.
- [13] Инструкция по микробиологическому контролю быстрозамороженной плодоовощной продукции. МЗ СССР, М., 29.09.89
- [14] ИСО 11290-2:1998 Микробиология продуктов питания и животных кормов. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета микроорганизмов *Listeria monocytogenes*. Часть 2. Метод подсчета
- [15] Регистрационное удостоверение № 98/267 Набор реактивов для микробиологических исследований. Фирма «Биомерье» («BioMerieux»), Франция. Минздрав РФ/23.02.98
- [16] ТУ 9385-670-00419779—2001 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ)
- [17] Регистрационное удостоверение № 98/1589 Сухие питательные среды производства фирмы «HiMedia» (Индия), Минздрав РФ/17.12.98
- [18] ТУ 9385-669-00419779—2001 Питательный агар для выделения и культивирования листерий (ПАЛ)
- [19] ВФС 42-2988—97 Среда питательная ГРМ № 1 для контроля микробной загрязненности, сухая (для выращивания бактерий). Минздрав РФ, 1997
- [20] Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Минздрава СССР, утвержденные в 1981 г.

ОКС 01.100.30	H11	H26	ОКСТУ 9109
67.080.20	H12	H27	9209
67.100	H14	H28	9709
67.120	H16	H61	
	H17	H65	
	H21	C42	
	H24	C43	
	H25		

Ключевые слова: пищевые продукты, мясо, субпродукты, мясные продукты, рыба, нерыбные объекты промысла, рыбные продукты, молоко, молочные продукты, маргарин, майонез, свежие и свежемороженые овощи, картофель, салаты из овощей, *Listeria monocytogenes*, питательные среды, отбор и подготовка проб, селективное обогащение, выделение культур микроорганизмов, идентификация листерий, оценка результатов

---