|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ**  **(ЕАСС)**  **EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION**  **(EASC)** | | |
| Picture in Документ1 | **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ**  **СТАНДАРТ** | **ГОСТ 32031–**  *(проект,*  *первая редакция)* |

**ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ**

**Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других**

**видов *Listeria* (*Listeria* spp.)**

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

**Минск**

**Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации**

**20\_\_\_**

**Предисловие**

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены [ГОСТ 1.0](http://docs.cntd.ru/document/1200128307) «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и [ГОСТ 1.2](http://docs.cntd.ru/document/1200128308) «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандартом)

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № от )

За принятие проголосовали:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97 | Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97 | Сокращенное наименование  национального органа по стандартизации |
|  |  |  |
|  |  |  |

4 ВЗАМЕН ГОСТ 32031-2012

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»*

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

|  |
| --- |
| **ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ**  **Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других**  **видов *Listeria* (*Listeria* spp.)**  Food products. Methods for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria*  (*Listeria* spp.) |

**Дата введения –**

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, объекты производственной среды (смывы с технологического оборудования, тары, инвентаря, стен, полов, одежды и рук работников) и устанавливает методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria (Listeria* spp.).

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

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

ГОСТ 26670 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 30425 Консервы. Метод определения промышленной стерильности

ГОСТ ISO 707 Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ ISO 16140 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов

ГОСТ ISO 17604\* Микробиология пищевой цепи. Отбор проб с туши для микробиологического анализа

ГОСТ ISO/TS 17728 Микробиология пищевой цепи. Методы отбора проб пищевой продукции и кормов для микробиологического анализа

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ 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 термины по ГОСТ ISO 11133, а также следующие термины с соответствующими определениями.

3.1 ***Listeria monocytogenes*:** Микроорганизмы, образующие типичные колонии на плотных селективных средах и идентифицируемые по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам в соответствии с настоящим стандартом.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 17604-2011 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Отбор проб с туши для микробиологического анализа».

3.2 **обнаружение *Listeria monocytogenes*:** Определение наличия или отсутствия бактерий *Listeria monocytogenes* в определенной массе или объеме продукта или на определенной поверхности в соответствии с настоящим стандартом.

3.3 **бактерии рода** **Listeria (*Listeria* spp.):**Микроорганизмы, которые образуют типичные колонии на плотных селективных средах и идентифицируемые по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам в соответствии с настоящим стандартом.

3.4 **обнаружение бактерий рода *Listeria* (*Listeria* spp.):** Определение наличия или отсутствия *Listeria* spp. в определенной массе или объеме продукта или на определенной поверхности в соответствии с настоящим стандартом.

**4 Сокращения**

В настоящем стандарте используют следующие сокращения.

**ALOA** – агар Listeria пo Оттавиани и Агости.

**ГРМ** – гидролизат рыбной муки.

**ИФА** – иммуноферментный анализ.

**МПА** – мясопептонный агар.

**МПБ** – мясопептонный бульон.

**ПАЛ** – питательный агар для выделения листерий.

**ПБЛ** – питательный бульон для выделения листерий.

**ПЦР** – полимеразная цепная реакция.

**TSYEA** – триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом.

**TSYEB** – триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом.

**VP** – реакция Фогеса-Проскауэра.

**5 Сущность метода**

Метод выявления бактерий *L. monocytogenes* и других видов *Listeria (Listeria* spp.) в определенной массе или объеме продукта, а также на определенной площади поверхности производственной окружающей среды состоит из четырех последовательных этапов (см. 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 и приложение А).

5.1 Первичное обогащение анализируемой пробы в жидкой среде со сниженной концентрацией селективных компонентов (полуконцентрированный бульон Фразера) при температуре 30 °С в течение 24–26 ч.

П р и м е ч а н и е – Бактерии рода *Listeria* в продукте могут находиться в небольшом количестве, очень часто на фоне значительного количества микроорганизмов других родов. Поэтому для выявления небольшого количества бактерий рода *Listeria*, а так же «поврежденных» клеток в пробе необходим этап селективного обогащения на среде с пониженной концентрацией селективных компонентов.

Присутствие *L. monocytogenes* может быть замаскировано присутствием других видов Listeria, в частности *L. innocua* или *L. ivanovii.*

5.2 Вторичное обогащение посевного материала, полученного по 5.1 в жидкой среде с полной концентрацией селективных компонентов (бульон Фразера) при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч при выявлении *L. monocytogenes* и 48 ч – при выявлении *Listeria* spp. В случае использования другой жидкой питательной среды следует руководствоваться рекомендациями производителя.

5.3 Пересев посевного материала, полученного по 5.1 и 5.2, параллельно на две плотные селективные среды:

а) первая среда (обязательная): ALOA;

П р и м е ч а н и е – Допускается использование других сред с тем же составом.

б) вторая среда (обязательная): одна из плотных селективных сред, на выбор лаборатории: Оксфорд агар или Палкам агар или ПАЛ или другие хромогенные среды, отличные от первой среды (см. 5.3 (а).

Посевы на средах ALOA культивируют при температуре (37 ± 1) °С и просматривают через (24 ± 3) ч, при необходимости культивируют еще через (24 ± 3) ч, контролируя наличие роста колоний, характерных для *L. monocytogenes* или других видов *Listeria*.

П р и м е ч а н и е – Некоторые *L. monocytogenes* характеризуются медленной активностью PIPLC (фосфатидилинозитолфосфолипазы C). Такие бактерии проявляют ее после окончания времени культивирования, например, через 4 дня.

Некоторые *L. monocytogenes* образуют очень слабую зону помутнения среды вокруг колоний в случаях испытанного стресса, в частности кислотного.

Температура и продолжительность инкубации на второй селективной среде определяется согласно рекомендациям производителя питательных сред.

5.4 Подтверждение

Колонии с характерным для *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria* spp.*)* ростом, полученные по 5.3, пересевают на поверхность плотных неселективных питательных сред и культивируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч для дальнейшего подтверждения по тестам идентификации.

**6 Питательные среды, тест-системы и реактивы**

**6.1 Общие требования**

Состав и приготовление питательных сред и реактивов – в соответствии с приложением Б.

**6.2 Селективные среды первичного обогащения**

В качестве селективных сред первичного обогащения могут быть использованы следующие среды.

6.2.1 Бульон Фразера полуконцентрированный – по Б.1.1.

6.2.2 Селективный накопительный бульон UVM – по Б.1.2.

6.2.3 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I) – по Б.1.3.

**6.3 Селективные среды вторичного обогащения**

В качестве селективных сред вторичного обогащения могут быть использованы следующие среды.

6.3.1 Бульон Фразера – по Б.2.1.

6.3.2 Селективный накопительный бульон (UVM II) – по Б.2.2.

6.3.3 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II) – по Б.2.3.

**6.4 Селективные плотные среды**

В качестве первой среды необходимо использовать следующую среду.

6.4.1 Агар Listeria пo Оттавиани и Агости (ALOA) – по Б.3.1.1.

П р и м е ч а н и е – Допускается использование других хромогенных сред с тем же составом (см. 5.3 (а).

В качестве второй среды необходимо использовать одну из следующих сред.

6.4.2 Оксфорд агар – по Б.3.2.1.

6.4.3 Палкам агар – по Б.3.2.2.

6.4.4 Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ) – по Б.3.2.3.

6.4.5 Бриллианс Listeria агар (BRILLIANCE LISTERIA agar) – по Б.3.2.4.

Выбор второй среды – на усмотрение испытательной лаборатории.

**6.5 Питательные среды для изучения культурально-морфологических свойств бактерий рода *Listeria***

**6.5.1 Плотные неселективные питательные среды**

6.5.1.1 Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) – по Б.4.1.1.

6.5.1.2 Трипказо-соевый агар (TSA) – по Б.4.1.2.

6.5.1.3 Мясопептонный агар (МПА) – по Б.4.1.3.

**6.5.2 Жидкие неселективные питательные среды**

6.5.2.1 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) – по Б.4.2.1.

6.5.2.2 Трипказо-соевый бульон (TSB) – по Б.4.2.2.

6.5.2.3 Мясопептонный бульон (МПБ) – по Б.4.2.3.

**6.6 Среды и реактивы для подтверждения рода *Listeria* (*Listeria* spp*.)***

6.6.1 Раствор с объемной долей перекиси водорода 3 % – по

[ГОСТ 10444.1](kodeks://link/d?nd=1200021065&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и ...’’(утв. постановлением Госстандарта СССР от 17.01.1984)Применяется с 01.07.1985 ...Статус: действующая редакцияПрименяется для целей технического регламента).

6.6.2 Растворы и реактивы для окраски по Граму – по

[ГОСТ 10444.1](kodeks://link/d?nd=1200021065&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и ...’’(утв. постановлением Госстандарта СССР от 17.01.1984)Применяется с 01.07.1985 ...Статус: действующая редакцияПрименяется для целей технического регламента).

6.6.3 Коммерческие наборы для окраски по Граму – согласно инструкции изготовителя.

6.6.4 Среда для определения подвижности бактерий – по Б.8.

6.6.5 Среда для определения лецитиназной активности – по Б.10.1 и Б.10.2.

6.6.6 Среда и реактивы для реакции Фогеса-Проскауэра (VP) – по Б.10.3.

**6.7 Среды и реактивы для дальнейшего подтверждения *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria***

**6.7.1 Среда и реактив для определения****-гемолитической активности**

6.7.1.1 Кровяной агар – по Б.5.

6.7.1.2 Суспензия из эритроцитов барана – по Б.6.

**6.7.2 Буфер фосфатно-солевой** – **по Б.11.**

**6.7.3 Среда для проведения КАМП-теста** – по Б.9 (при необходимости).

**6.7.4 Среды для определения ферментативных свойств культуры** – по Б.7.1 и Б.7.2.

**6.7.5 Углеводы** – по Б.7.1.2.

6.7.5.1 Рамноза.

6.7.5.2 Ксилоза.

**6.8 Среды и реактивы для взятия смывов:**

6.8.1 Нейтрализатор – по Б.12.

6.8.2 Пептонная вода – по Б.13.

**7 Средства измерений, аппаратура, посуда, материалы и тест-штаммы**

Аппаратура и материалы по

[ГОСТ 10444.1](kodeks://link/d?nd=1200021065&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и ...’’(утв. постановлением Госстандарта СССР от 17.01.1984)Применяется с 01.07.1985 ...Статус: действующая редакцияПрименяется для целей технического регламента) и

[ГОСТ ISO 7218](kodeks://link/d?nd=1200093839&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ ISO 7218-2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям’’Статус: применяется для целей технического регламента) со следующими дополнениями.

pH-метр с точностью измерения ± 0,01 ед. pH при 25 °C.

Шкаф сушильный стерилизационный для сухой стерилизации или автоклав для влажной стерилизации.

Термостат, поддерживающий температуру между (25 ± 1) °С и (50 ± 1) °С.

Термостаты, поддерживающие температуры: (25 ± 1) °С, (30 ± 1) °С, (37 ± 1) °С.

Баня водяная, поддерживающая температуру 44 °С – 47 °С.

Петля, игла из платиново-иридиевого или никель-хромового сплава или пластиковая диаметром 3 мм или 10 мкл.

Шпатели стеклянные формы хоккейной клюшки.

Пробирки стерильные.

Колбы и флаконы необходимой вместимости.

Дозаторы автоматические переменного объема.

Наконечники одноразовые, стерильные для дозаторов.

Чашки Петри стеклянные или пластиковые диаметром от 90 до 100 мм.

Микроскоп для фазово-контрастной микроскопии.

Рамки-трафареты.

Одноразовое оборудование и материалы – по

[ГОСТ ISO 7218](kodeks://link/d?nd=1200124386&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ ISO 7218-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие ...’’(утв. приказом Росстандарта от 28.09.2015 N 1392-ст)Статус: действует с 01.07.2016Применяется для целей технического регламента).

Контрольные тест-штаммы:

- S. aureus (при необходимости);

- R. equi (при необходимости);

- L. innocua;

- L. ivanovii (при необходимости);

- L. monocytogenes;

- E. faecalis;

- E. coli.

Материалы для отбора смывов:

- стерильный тампон с хлопком или синтетическим материалом в пробирке или без;

- стерильная ткань (или салфетка), не содержащая ингибирующих веществ;

- стерильная губка с ручкой или без нее, без ингибирующих веществ.

Допускается применение других средств измерений, аппаратуры с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не хуже указанных в настоящем стандарте.

**8 Отбор и подготовка проб к исследованию**

8.1. Отбор и подготовка проб пищевых продуктов – по ГОСТ ISO/TS 17728, ГОСТ ISO 707, ГОСТ ISO 17604, ГОСТ 26669, ГОСТ 26670.

8.2. Отбор проб (смывов) с объектов окружающей производственной среды (технологического оборудования, тары, инвентаря, стен и полов производственных цехов, одежды и поверхности рук работников) осуществляется согласно приложению В с учетом нижеследующего:

- при отборе смывов с влажной поверхности допускается использовать сухой тампон/губку/ткань (салфетку) при условии отсутствия необходимости использования нейтрализатора;

- при отборе смывов с сухой поверхности необходимо использовать тампон [губку/ткань (салфетку)], увлажненный нейтрализатором (см. 6.8.1) – в случае отбора смывов после дезинфекции) или пептонной водой (см. 6.8.2) . – в остальных случаях;

- смывы с площади меньше или равной 10×10 см (100 см2) отбирают стерильным тампоном с хлопком или синтетическим материалом;

- при отборе смывов с площади более 100 см2 следует использовать губку/ткань (салфетку);

- смывы с мелких объектов (поверхность которых менее 100 см2) берут со всей поверхности;

- при взятии смывов с ровной поверхности рекомендуется использовать стерильные металлические рамки-трафареты, ограничивающие площадь взятия смывов, которые должны быть обеззаражены с помощью нейтрализатора (см. 6.8.1) перед каждым повторным использованием;

- при взятии смывов с рук стерильными и увлажненными ватными тампонами тщательно протирают не менее 5 раз ладони, а также пальцы, межпальцевое пространство и особенно ногтевое ложе. С перчаток смывы берут только со стороны ладоней;

- смывы с санитарной одежды отбирают с помощью тампонов с четырех участков, каждая из которых должна быть не менее 25 см2, а именно нижняя часть каждого рукава и две площадки с верхней и средней частей передних пол одежды;

- для отбора проб в труднодоступных небольших участках следует использовать тампоны.

П р и м е ч а н и е – Для увеличения извлекаемости микроорганизмов с области отбора смывов рекомендуется использовать увлажненные тампоны.

**9 Проведение испытания**

Схема проведения испытания пищевой продукции и смывов приведена в приложении А.

**9.1 Проба для анализа и исходная суспензия**

Анализируемую пробу X (г или см3) вносят в селективную среду первичного обогащения, исходя из соотношения продукта и среды 1:9.

Смывы, отобранные по 8.2, вносят в селективную среду первичного обогащения согласно приложению Б.

**9.2 Первичное обогащение**

Исходную суспензию (см. 9.1) культивируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (25 ч ± 1) ч.

**9.3 Вторичное обогащение**

9.3.1 Посевной материал, полученный по 9.2 в объеме 0,1 см3, пересевают в пробирку, содержащую 10 см3 среды селективного обогащения (см. 6.3).

9.3.2 Посевы (см. 9.3.1) культивируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч (для бульона Фразера). В случае использования другой селективной жидкой питательной среды продолжительность культивирования согласно инструкции производителя.

П р и м е ч а н и е: Посевы на полуконцентрированном бульоне Фразера и бульоне Фразера после окончания культивирования перед пересевом на селективный агар допускается хранить при температуре 5 ° C не более 72 ч.

**9.4 Пересев на плотные селективные среды**

9.4.1 Посевной материал, полученный после первичного и вторичного обогащения (см. 9.2 и 9.3) с помощью бактериологической петли пересевают на поверхность первой плотной селективной среды (см. 6.4.1) так, чтобы получить хорошо изолированные колонии.

Аналогичным образом проводят пересев и на вторую плотную селективную среду (см. 6.4.2 или 6.4.3, или 6.4.4).

9.4.2 Чашки с посевами на первой плотной селективной среде (см. 9.4.1) культивируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч.

Чашки с посевами на второй плотной селективной среде инкубируют согласно инструкции производителя питательных сред.

9.4.3 Через (24 ± 3) ч или (48 ± 2) ч [если после (24 ± 3) ч отмечен слабый рост культуры или его отсутствие] культивирования на первой и второй плотной селективной средах (10.4) учитывают наличие колоний с ростом характерных для бактерий рода *Listeria и Listeria monocytogenes*.

9.4.3.1 На первой селективной плотной среде бактерии вида *L. monocytogenes и L. ivanovii* растут в виде сине-зеленых колоний, окруженные непрозрачным ореолом (типичные колонии). Другие виды бактерий рода *Listeria* также растут в виде сине-зеленых колоний, без ореола.

П р и м е ч а н и я

1 Некоторые штаммы *L. monocytogenes* могут давать очень слабый ореол помутнения питательного агара вокруг колонии или вовсе не иметь его. Это характерно для «поврежденных» клеток *L. monocytogenes* (например, вследствие воздействия кислот).

2 Некоторые штаммы *L. monocytogenes* характеризуются пониженной фосфатидилинозитолфосфолипазной С активностью. Для выявления таких штаммов требуется более продолжительное культивирование.

3 После инкубации посевы на плотных селективных средах до начала следующих тестов допускается хранить не более двух дней при температуре 5 ° C .

9.4.4.2 Посевы на второй плотной селективной среде просматривают на наличие колоний с ростом характерным для бактерий рода *Listeria*.

На Палкам агаре все виды бактерий рода *Listeria* формируют мелкие серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом, иногда с черным центром.

На Оксфорд агаре все виды бактерий рода *Listeria* формируют мелкие сероватые колонии, окруженные черным ореолом.

На ПАЛ все виды бактерий рода *Listeria* формируют мелкие серовато-желтые колонии с черным ореолом.

На Бриллианс Listeria агаре (BRILLIANCE LISTERIA agar) бактерии вида *L. monocytogenes и L. ivanovii* растут в виде сине-зеленых колоний, окруженные непрозрачным ореолом (типичные колонии). Другие виды бактерий рода *Listeria* растут в виде сине-зеленых колоний, без ореола.

9.4.4.3 При отсутствии колоний с ростом характерным для *Listeria monocytogenes* и рода *Listeria* (*Listeria* spp.) как на первой так и на второй плотных селективных средах, исследование прекращают и делают заключение, в зависимости от поставленной задачи, об отсутствии в исследуемой пробе бактерий *Listeria monocytogenes* или рода *Listeria* (*Listeria* spp.)*.*

**9.5 Подтверждение принадлежности выделенных культур к роду *Listeria***

**9.5.1 Выбор колоний для подтверждения**

9.5.1.1 С каждой чашки с плотной селективной средой (см. 9.4.3.) отбирают по пять колоний с ростом, характерным для бактерий рода *Listeria.*

Если на чашке выросло менее пяти типичных колоний, отбирают их все.

9.5.1.2 Отобранные колонии пересевают на поверхность подсушенного плотного неселективного питательного агара (см. 6.5.1.1–6.5.1.3) так, чтобы получить изолированные колонии.

Посевы культивируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

На плотных неселективных питательных средах бактерии *Listeria* spp.растут в виде выпуклых, бесцветных и непрозрачных колоний в диаметре от 1,0 до 2,0 мм. Когда чашку Петри просматривают на свету (искусственном или естественном) под углом около 45 ° колонии имеют сине-серый цвет и зернистую поверхность.

Достаточно одной подтвержденной типичной колонии на образец. Если первая колония будет отрицательна, для проведения идентификации используют остальные отобранные колонии.

Для подтверждения принадлежности выделенной культуры к бактериям рода *Listeria* проводят тесты, приведенные в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 – Подтверждающие тесты на бактерии рода *Listeria*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Статус тестов | Тесты для идентификации бактерий рода *Listeria* | Результаты |
| Обязательные | Микроскопия | Тонкие короткие грамположительные палочки или коккобациллы |
| Реакция на каталазу | + |
| Необязательные | VP тест | + |
| Подвижность при 25 °С | + |

**9.5.2 Микроскопия**

Культуры, выделенные по 9.5.1.2, окрашивают по Граму по

[ГОСТ 30425](kodeks://link/d?nd=1200022909&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ 30425-97 Консервы. Метод определения промышленной стерильности’’(утв. постановлением Госстандарта России от 18.08.1997 N 279)Статус: действующая редакцияПрименяется для целей технического регламента) и микроскопируют.

Бактерии рода *Listeria* spp*.* представляют собой грамположительные тонкие, короткие палочки или коккоподобные палочки.

**9.5.3 Реакция на каталазу**

Берут изолированную колонию, выделенную по 9.5.1.2, и вносят в каплю 3 %-ого раствора перекиси водорода (см. 6.6.1). Мгновенное образование пузырьков газа указывает на положительную реакцию.

Бактерии *Listeria* spp.являются каталазоположительными.

**9.5.4 Реакция Фогеса-Проскауэра (VP)**

Пробирку, содержащую 3 см3 среды VP (Б.10.3.1) инокулируют с помощью петли культурой, полученной по 9.5.1.2, и инкубируют при температуре 37 °С в течение (24 ± 3) ч. После инкубации добавляют 0,6 см3 5 %-ного раствора α-нафтола (Б.10.3.2) и 0,2 см3 40 %-ного раствора гидроксида калия (Б.10.3.3), хорошо встряхивают, наклоняя пробирку, чтобы увеличить площадь поверхности раздела воздух-жидкость и учитывают результата через 15 мин и 1 ч. Положительная реакция обозначена ярко-красным цветом раствора.

**9.5.5 Определение подвижности**

Культуру, выделенную по 9.5.1.2, пересевают в жидкую неселективную питательную среду (см. 6.5.2.1–6.5.2.3).

Посевы культивируют при температуре (25 ± 1) °С от 8 до 24 ч до появления мутности в бульоне. Затем каплю культуральной жидкости помещают на предметное стекло, накрывают сверху покровным стеклом и микроскопируют.

В поле зрения микроскопа должны наблюдаться короткие палочки с опрокидывающими движениями.

При культивировании посевов в жидкой питательной среде при температуре выше (25 ± 1) °С подвижность бактерий не наблюдается.

В качестве альтернативного теста определения подвижности можно использовать посев культуры уколом в питательную среду (см. 6.6.4).

Посевы культивируют в термостате при температуре (25 ± 1) °С в течение 48 ч.

Бактерии *Listeria spp.*подвижны при температуре (25 ± 1) °С, образуют характерный рост вокруг линии укола, похожий на зонтик. Если рост слабый необходимо культивировать еще пять суток с ежедневным просмотром посевов.

**9.6 Подтверждение *Listeria monocytogenes***

Для подтверждения *Listeria monocytogenes*культуры, полученные по 9.5.1.2, исследуют в соответствии с тестами, приведенными в таблице 2.

Т а б л и ц а 2 – Подтверждающие тесты на *L. monocytogenes*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Статус тестов | Тесты для идентификации *L.monocytogenes* | Результаты |
| Обязательные | Микроскопия\* | Тонкие короткие грамположительные палочки или коккобациллы |
| Β-гемолиз | + |
| Ферментация L-рамнозы | + |
| Ферментация D-ксилозы | - |
| Необязательные | Реакция на каталазу | + |
| Подвижность при 25 °С | + |
| КАМП-тест | + |
| \* Микроскопия необязательна для колоний, отобранных с первой и для второй плотной селективной среды, если они позволяют различать патогенные и непатогенные виды *Listeria* spp. | | |

**9.6.1 Определение бета-гемолитической активности**

9.6.1.1 С использованием кровяного агара

Поверхность кровяного агара (см. 6.7.1.1) перед использованием необходимо тщательно подсушить. Чашку с тыльной стороны целесообразно разделить на квадраты и проколоть каждый маркированный квадрат бактериальной иглой с колонией культуры, полученной по 9.5.1.2. На каждую чашку с кровяным агаром, кроме исследуемых культур, должны быть посеяны контрольные штаммы, такие как *L. monocytogenes* (положительный контроль) и *L. innocua* (отрицательный контроль).

Посевы культивируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

Зона ß-гемолиза на кровяном агаре у культуры *L. monocytogenes* – в виде узкой, чистой, светлой зоны; *L. innocua* – нет зоны гемолиза вокруг укола; *L. seeligeri* – слабая зона гемолиза; *L. ivanovii* – широкая, четко обозначенная зона гемолиза.

После инкубирования проводят визуальное сравнение прозрачности зон вокруг анализируемых и контрольных культур.

П р и м е ч а н и е – Зона ß-гемолиза более четко видна при удалении колонии с поверхности агара вокруг места посева.

9.6.1.2 С использованием суспензии эритроцитов барана

В 0,15 см3 жидкой неселективной питательной среды (см. 6.5.2) необходимо внести одну колонию культуры, полученную по 9.5.1.2.

Посевы культивируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Затем добавляют 0,15 см3 суспензии эритроцитов барана (см. 6.7.1.2) и продолжают культивирование при температуре (37± 1) °С от 15 до 60 мин, с последующим охлаждением при температуре (3 ± 2) °С около 2 ч.

При наличии у культуры гемолитической активности – жидкость окрашена в соломенно-коричневый цвет и отсутствует осадок красных кровяных клеток на дне лунки.

При отсутствии гемолитической активности наблюдается осадок красных кровяных клеток на дне лунки. Клетки могут быть красно-коричневыми по цвету.

Если реакция неопределенная, следует оставить культуру при температуре (3 ± 2) °С на 24 ч.

**9.6.2 Определение лецитиназной активности (при необходимости)**

При необходимости изучения лецитиназной активности культуры, полученной по 9.5.1.2 можно использовать лецитин-агар с активированным углем и без угля.

Поверхность лецитин-агара с активированным углем и без угля (см. 6.6.5) перед использованием необходимо тщательно подсушить. Чашку с тыльной стороны целесообразно разделить на квадраты и высевать на каждый маркированный квадрат бактериологической петлей колонию культуры, отобранной с триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом (см. 10.5.1.2). На каждую чашку с лецитин-агаром с активированным углем и без угля, кроме исследуемых культур, должен быть посеян контрольный штамм *L. monocytogenes* (положительный контроль).

Посевы культивируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч.

*L. monocytogenes* при росте дает плотную зону помутнения шириной 3,0–6,0 мм на лецитин-агаре с активированным углем за счет гидролиза лецитина.

*L. monocytogenes* при росте не дает плотную зону помутнения на лецитин-агаре без активированного угля.

**9.6.3 Определение ферментативных свойств *L. monocytogenes***

У культур, полученных по 9.5.1.2, определяют ферментативные свойства. Для этого используют суточную культуру.

Посевы следует культивировать при температуре (37 ± 1) °С.

Положительную реакцию в отношении углеводов определяют по изменению окраски среды в желтый цвет за счет образования кислоты. Изменение цвета среды происходит, как правило, в течение 24–48 ч. При использовании микрообъемов питательных сред ферментативные реакции протекают быстрее. Продолжительность культивирования согласно инструкции производителя питательных сред.

П р и м е ч а н и е – Для изучения биохимических свойств выделенных по 9.5.1.2 колоний можно использовать следующие коммерческие тест-системы: Listeria ID MID-67, Microbact 12L, API Listeria.

**9.6.4 КАМП-тест**

В случае возникновения сомнений при интерпретации результатов гемолитического теста допускается использовать КАМП-тест как вспомогательный тест.

Существуют редкие штаммы *L. monocytogenes*, которые не показывают β-гемолиз или положительную реакцию на КАМП-тесте в условиях, описанных в настоящем стандарте.

Двухсуточные культуры гемолитических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi* высевают на кровяной агар, как показано на рисунке 1.

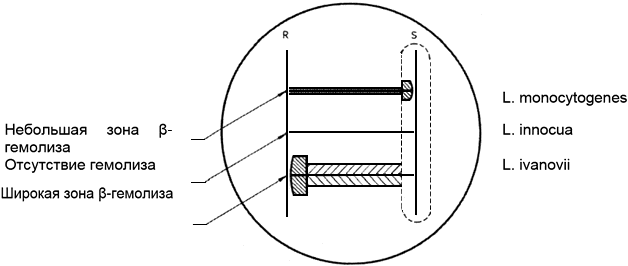


Рисунок 1 – Посев и интерпретация КАМП-теста

Между вертикальными линиями *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi* засевают параллельными линиями исследуемые культуры на расстоянии друг от друга не менее 1 см и от вертикальных линий – 0,5 см.

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

Для положительного контроля рекомендуется провести посев тест-штамма *Listeria monocytogenes* аналогично посеву исследуемых культур.

После культивирования посевов отмечают изменение (расширение и просветление) зоны гемолиза в зонах, соседствующих с вертикальными штрихами *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi.*

*Listeria monocytogenes* дает положительную реакцию (расширение и просветление зоны гемолиза) около штриха *Staphylococcus aureus* и отрицательную (отсутствие изменений в зоне гемолиза) – около штриха *Rhodococcus equi*.

**9.7 Интерпретация морфологических и физиологических свойств и биохимических реакций**

Все *Listeria spp.* – мелкие, грамположительные ~~палочки или~~ коккоподобные палочки, которые дают положительную реакцию в тесте VP и являются каталазоположительными.

*L. monocytogenes* отличаются от других видов *Listeria spp.* признаками, указанными в таблице 3.

**9.8 Ускоренное обнаружение и идентификация бактерий *Listeria* spp. и *Listeria monocytogenes* с использованием различных тестов и тест-систем**

Для ускоренного обнаружения (скрининга) и идентификации *Listeria* spp. и *Listeria monocytogenes д*опускается использование валидированных по ГОСТ ISO 16140 тестов и тест-систем в соответствии с инструкциями производителя, в том числе следующих.

**9.8.1 Идентификация бактерий до рода *Listeria***

Listeria Latex Kit.

Singlepath Listeria.

VIDAS Listeria Duo (LDUO).

API Listeria

**9.8.2 Идентификация бактерий *Listeria monocytogenes***

VIDAS Listeria monocytogenes II (LMO2).

VIDAS L. monocytogenes Xpress (LMX).

SinglepathL’mono.

API Listeria.

BAX System PCR assay for L. monocytogenes.

BAX System PCR assay for L. monocytogenes 24E.

TaqMan Listeria monocytogenes Detection Kit и Prep Man Ultra Sample Preparation Reagent.

Foodproof Listeria monocytogenes Detection Kit, 5’nuclease.

MDS Cистема молекулярного анализа.

**9.9 Типирование выделенных штаммов *Listeria monocytogenes***

По эпидемиологическим показаниям штаммы, идентифицированные как *L. monocytogenes,* направляют в референс лаборатории для серотипирования и/или генотипирования.

**10 Обработка результатов испытаний**

Обработку результатов проводят по

[ГОСТ ISO 7218](kodeks://link/d?nd=1200093839&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ ISO 7218-2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям’’Статус: применяется для целей технического регламента) и отмечают наличие или отсутствие *L. monocytogenes и Listeria* spp.в исследованной пробе с указанием массы в граммах, объема в см3 или площади в см2.

**11 Оформление протокола испытания**

В протоколе испытания необходимо указать метод испытания и полученные результаты. В нем должны быть также упомянуты все процедуры, не указанные в настоящем стандарте, или рассматриваемые как дополнительные, а также сведения о любых случаях, вероятно повлиявших на результаты.

В протокол испытаний должна быть включена вся информация, необходимая для точной идентификации образца.

**12 Требования безопасности**

Требования к безопасности при выполнении работ и квалификации оператора – по ГОСТ ISO 7218.

Для защиты здоровья лабораторного персонала настоятельно рекомендуется проводить работу, связанную с выявлением *L. monocytogenes и Listeria spp.,* в лабораториях с квалифицированным микробиологом и соблюдать особую осторожность при работе с зараженным материалом. В частности, не рекомендуется беременному персоналу работать с бактериями *L. monocytogenes и Listeria spp..*

**Приложение А**

(обязательное)

**Схема проведения испытания**

|  |
| --- |
| Проба для анализа X г или X см3 + среда первичного обогащения  (полуконцентрированный бульон Фразера) в соотношении 1:9 |
| Инкубация при температуре 30 °С ± 1 °С в течение (25 ± 1) ч |

|  |  |
| --- | --- |
|  | 0,1 см3 культуры в 10 см3 среды вторичного обогащения (бульон Фразера) |
| Инкубация при температуре  (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч \* |
| Пересев на агар Listeria по Оттавиани и Агости (ALOA)  и еще на одну из селективных плотных сред | |
| Инкубация на агаре Listeria по Оттавиани и Агости (ALOA) при температуре 37 °С в течение (24 ± 2) ч и при необходимости еще (24 ± 2) ч \*\*  Инкубация на второй селективной среде в соответствии с инструкцией производителя | |
| Подтверждение *L. monocytogenes или Listeria* spp. | |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\*В случае использования других питательных сред для первичного и вторичного обогащения, отличных от бульона Фразера, время инкубации определяется рекомендациями производителя.

\*\*В случае исследования образца на наличие *Listeria* spp. дополнительная 24-часовая инкубация среды вторичного обогащения (бульон Фразера) позволяет выявить большее количество видов

**Приложение Б**

**(обязательное)**

**Состав и приготовление питательных сред и реактивов**

**Б.1 Селективные среды первичного обогащения**

**Б.1.1 Полуконцентрированный бульон Фразера (Half Fraser broth)**

**Б.1.1.1 Основа среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| мясной пептон (пептический перевар животной ткани) | 5,0 г |
| триптон (ферментативныйгидролизат казеина) | 5,0 г |
| мясной экстракт | 5,0 г |
| дрожжевой экстракт | 5,0 г |
| хлорид натрия | 20,0 г |
| натрий фосфорнокислый двухзамещенный | 12,0 г |
| калий фосфорнокислый однозамещенный | 1,35 г |
| эскулин | 1,0 г |
| дистиллированная вода | 1000 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, нагревая при необходимости.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,2 ± 0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Разливают основу среды в колбы или флаконы соответствующего объема в количестве необходимом для проведения анализа (см. 10.1) и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

П р и м е ч а н и е – Раствор хлорида лития и раствор налидиксовой кислоты могут быть добавлены в основу до стерилизации.

**Б.1.1.2 Растворы селективных добавок**

Б.1.1.2.1 Раствор хлорида лития

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| хлорид лития | 3,0 г |
| дистиллированная вода | 10,0 см3 |

Приготовление.

Хлорид лития растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

**Предупреждение** – Необходимо принимать все меры предосторожности при растворении хлорида лития в воде, так как реакция является экзотермической. Раствор хлорида лития раздражает слизистую оболочку.

Б.1.1.2.2 Раствор натриевой соли налидиксовой кислоты

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| натриевая соль налидиксовой кислоты | 0,1 г |
| 0,05 моль/дм3 раствор гидроксида натрия | 10,0 см3 |

Приготовление.

Натриевую соль налидиксовой кислоты растворяют в растворе гидроксида натрия и стерилизуют раствор путем фильтрования.

Б.1.1.2.3 Раствор акрифлавин гидрохлорида

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| акрифлавин гидрохлорид | 0,25 г |
| дистиллированная вода | 100 см3 |

Приготовление.

Акрифлавин гидрохлорид растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

Б.1.1.2.4 Раствор цитрата аммонийного железа (III)

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| цитрат аммонийного железа (III) | 5,0 г |
| дистиллированная вода | 100 см3 |

Приготовление.

Цитрат аммонийного железа (III) растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

**Б.1.1.3 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| основа среды (см. Б.1.1.1) | 100 см3 |
| раствор хлорида лития (см. Б.1.1.2.1) | 1,0 см3 |
| раствор натриевой соли налидиксовой кислоты  (см. Б.1.1.2.2) | 0,1 см3 |
| раствор акрифлавин гидрохлорида (см. Б.1.1.2.3) | 0,5 см3 |
| раствор цитрата аммонийного железа (III) (см. Б.1.1.2.4) | 1,0 см3 |

Приготовление.

В основу среды добавляют четыре раствора селективных добавок непосредственно перед использованием.

**Б.1.2 Селективный накопительный бульон (UVM)**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| триптоза | 10,0 г |
| мясной экстракт | 5,0 г |
| дрожжевой экстракт | 5,0 г |
| хлористый натрий | 20,0 г |
| фосфорнокислый натрий двузамещенный | 12,0 г |
| калий фосфорнокислый однозамещенный | 1,35 г |
| эскулин | 1,0 г |
| налидиксовая кислота | 20,0 мг |
| акрифлавин гидрохлорид | 12,0 мг |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, нагревая при необходимости.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,2 ± 0,2) ед. рН. Разливают среду в колбы или во флаконы соответствующего объема в количестве 225 см3 и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Б.1.3 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I)**

**Б.1.3.1 Основа среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| гидролизат казеина ферментативный | 10,0 г |
| пептон мясной ферментативный | 15,0 г |
| гидролизат дрожжей автолизованных | 2,0 г |
| хлорид натрия | 3,5 г |
| хлорид лития | 3,0 г |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, нагревая при необходимости.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,0 ± 0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Разливают среду в колбы или флаконы соответствующего объема и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Б.1.3.2 Раствор селективной добавки**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| налидиксовая кислота | 10 мг |
| акрифлавин | 5 мг |
| полимиксин В сульфат | 5 мг |
| стерильная дистиллированная вода | 10 см3 |

Приготовление.

Налидиксовую кислоту, акрифлавин и сульфат полимиксина В растворяют в стерильной дистиллированной воде.

**Б.1.3.3 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| основа среды (см. Б.1.3.1) | 1000 см3 |
| раствор селективной добавки (см. Б.1.3.2) | 4,44 см3 |

Приготовление.

В основу среды добавляют раствор селективной добавки. Среду хранят не более двух суток в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

**Б.2 Селективные среды вторичного обогащения**

**Б.2.1 Бульон Фразера (Fraser broth)**

**Б.2.1.1 Основа среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| мясной пептон (пептический перевар животной ткани) | 5,0 г |
| триптон (ферментативныйгидролизат казеина) | 5,0 г |
| мясной экстракт | 5,0 г |
| дрожжевой экстракт | 5,0 г |
| хлорид натрия | 20,0 г |
| натрий фосфорнокислый двухзамещенный | 12,0 г |
| калий фосфорнокислый однозамещенный | 1,35 г |
| эскулин | 1,0 г |
| хлорид лития | 3,0 г |
| натриевая соль налидиксовой кислоты | 0,1 г |
| дистиллированная вода | 1000 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, нагревая ее при необходимости.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,2 ± 0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Разливают основу среды в колбы или флаконы соответствующего объема в количестве необходимом для проведения анализа и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Б.2.1.2 Растворы селективных добавок**

Б.2.1.2.1 Раствор акрифлавин гидрохлорида – по Б.1.1.2.3.

Б.2.1.2.2 Раствор цитрата аммонийного железа (III) – по Б.1.1.2.4.

**Б.2.1.3 Готовая среда**

Приготовление.

В пробирки с 10 см3 основы среды (см. Б.2.1.1) добавляют по 0,1 см3 раствора акрифлавин гидрохлорида (см. Б.2.1.2.1) и раствор цитрата аммонийного железа (III) (см. Б.2.1.2.2) непосредственно перед использованием.

**Б.2.2 Селективный накопительный бульон (UVM II)**

**Б.2.2.1 Основа среды**

Согласно Б.1.2.

**Б.2.2.2 Раствор акрифлавин гидрохлорида**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| акрифлавин гидрохлорид | 13 мг |
| стерильная дистиллированная вода | 10 см3 |

Приготовление.

Акрифлавин гидрохлорид растворяют в стерильной дистиллированной воде.

**Б.2.2.3 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| основа среды (см. Б.2.2.1) | 1000 см3 |
| раствор акрифлавин гидрохлорида (см. Б.2.2.2) | 4,44 см3 |

Приготовление.

К 1000,0 см3 основы среды (см. Б.2.2.1) добавляют раствор акрифлавин гидрохлорида (см. Б.2.2.2).

**Б.2.3 Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II)**

**Б.2.3.1 Основа среды**

Согласно Б.1.3.

**Б.2.3.2 Раствор селективной добавки**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| налидиксовая кислота | 10 мг |
| акрифлавин гидрохлорида | 5 мг |
| полимиксин В сульфат | 5 мг |
| стерильная дистиллированная вода | 5 см3 |

Приготовление.

Налидиксовую кислоту, акрифлавин гидрохлорид и полимиксин В сульфат растворяют в стерильной дистиллированной воде.

**Б.2.3.3 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| основа среды (см. Б.2.3.1) | 1000 см3 |
| раствор селективной добавки (см. Б.2.3.2) | 4,44 см3 |

Приготовление.

В основу среды (см. Б.2.3.1) добавляют раствор селективной добавки (см. Б.2.3.2) и разливают в стерильные пробирки по 10 см3. Среду хранят не более двух суток в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

**Б. 2.4 Бульон для обогащения Listeria monocytogenes (LMX Broth)**

**Б. 2.4.1 Основа среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| ферментативный перевар животных тканей (бычьих/свиных) | 5 г |
| ферментативный перевар казеина (бычий) | 5 г |
| мясной экстракт (бычий/свиной) | 5 г |
| дрожжевой экстракт | 5 г |
| Буфер | 18,32 г |
| Смесь солей | 11 г |
| Глюкоза | 2 г |
| Акрифлавин гидрохлорид | 0,005 г |
| Налидиксовая кислота | 0,01 г |
| Очищенная вода | 1000 см3 |

**Б.2.4.2. Раствор селективной добавки**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| Цефалексин | ≥ 1 % |
| Фосфомицин | ≥ 1 % |
| Смесь антибиотиков/противогрибковых препаратов | > 2 % |

**Б.3 Селективные плотные среды для пересева**

**Б.3.1 Первая среда**

Б.3.1.1 Агар Listeria no Оттавиани и Агости (ALOA)

Б.3.1.1.1 Основа среды

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| ферментативный перевар животного белка | 18,0 г |
| панкреатическийгидролизат казеина | 6,0 г |
| дрожжевой экстракт | 10,0 г |
| пируват натрия | 2,0 г |
| глюкоза | 2,0 г |
| глицерофосфат магния | 1,0 г |
| сульфат магния (безводный) | 0,5 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| хлорид лития | 10,0 г |
| натрий фосфорнокислый двузамещенный (безводный) | 2,5 г |
| 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-ß-D-глюкопиранозид | 0,05 г |
| агар | 12,0–18,0 г\* |
| дистиллированная вода | 930 см3\*\* |

\* В зависимости от плотности среды.

\*\* 925 см3, если используют раствор амфотерицина В

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют при нагревании в дистиллированной воде.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,2 ± 0,2). Разливают основу среды в колбы или флаконы соответствующего объема и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Б.3.1.1.2 Растворы селективных добавок

Б.3.1.1.2.1 Раствор налидиксовой кислоты

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| натриевая соль налидиксовой кислоты | 0,02 г |
| 0,05 моль/дм3 раствор гидроксида натрия | 5,0 см3 |

Приготовление:

Натриевую соль налидиксовой кислоты растворяют в 5 см3 0,05 моль/дм3 раствора гидроксида натрия и стерилизуют раствор путем фильтрования.

Б.3.1.1.2.2 Раствор цефтазидима

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| цефтазидим | 0,02 г |
| дистиллированная вода | 5,0 см3 |

Приготовление

Цефтазидим растворяют в 5 см дистиллированной воды и стерилизуют раствор путем фильтрования через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм.

Б.3.1.1.2.3 Раствор полимиксин В сульфата

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| полимиксин В сульфат | 76700,0 е.а. |
| дистиллированная вода | 5,0 см3 |

Приготовление.

Полимиксин В сульфат растворяют в 5 см3 дистиллированной воды и стерилизуют раствор путем фильтрования через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм.

Б.3.1.1.3 Растворы антибиотиков

Б.3.1.1.3.1 Раствор циклогексимида

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| циклогексимид | 0,05 г |
| этанол | 2,5 см3 |
| дистиллированная вода | 2,5 см3 |

Приготовление.

Циклогексимид растворяют в 2,5 см3 этанола, затем добавляют 2,5 см3 дистиллированной воды и стерилизуют раствор путем фильтрования через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм.

Б.3.1.1.3.2 Раствор амфотерицина В (используется как альтернатива для раствора циклогексимида)

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| амфотерицин В | 0,01 г |
| соляная кислота, 1 моль/дм3 раствор | 2,5 см3 |
| диметилформамид (DMF) | 7,5 см3 |

Приготовление.

Амфотерицин растворяют в растворе соляной кислоты и диметилформамида (DMF) и стерилизуют раствор путем фильтрования через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм.

**Предупреждение** - Раствор соляной кислоты и диметилформамид (DMF) очень токсичны. Обращаться с осторожностью.

Б.3.1.1.4 Дифференциальная добавка

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| L--фосфатидилинозитал (Sigma Р 6636)\* | 2,0 г |
| холодная дистиллированная вода | 50 см3 |

\* Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Приготовление.

L--фосфатидилинозитол (Sigma P 6636) растворяют в холодной дистиллированной воде. Раствор перемешивают в течение 30 мин до получения гомогенной суспензии. Автоклавируют при температуре 121 °С в течение 15 мин с последующим охлаждением до температуры (47 ± 2) °С.

Б.3.1.1.5 Готовая среда

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| основа среды (см. Б.3.1.1.1) | 930,0 см3\* |
| раствор налидиксовой кислоты (см. Б.3.1.1.2.1) | 5,0 см3 |
| раствор цефтазидима (см. Б.3.1.1.2.2) | 5,0 см3 |
| раствор полимиксина В сульфата (см. Б.3.1.1.2.3) | 5,0 см |
| раствор циклогексимида (см. Б.3.1.1.3.1) | 5,0 см3 |
| или амфотерицина В (см. Б.3.1.1.3.2) | 10,0 см3 |
| дифференциальная добавка (см. Б.3.1.1.4) | 50,0 см3 |

\* 925 см3, если используют раствор амфотерицина В

Приготовление.

В расплавленную и охлажденную на водяной бане до температуры (47 ± 2) °С основу среды, добавляют, тщательно перемешивая после каждого добавления, растворы ингибиторов, антибиотиков и добавок.

рН готовой среды должен составлять (7,2 ± 0 ,2) ед. рН.

Готовая среда должна быть гомогенной и непрозрачной.

В стерильные чашки Петри разливают свежеприготовленную готовую среду приблизительно по 15–20 см3 и дают агару затвердеть.

Непосредственно перед применением среда в чашках должна быть подсушена в соответствии с

[ГОСТ ISO 11133](kodeks://link/d?nd=1200093430&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ ISO 11133-1-2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие ...’’Статус: недействующий  (действ. с 01.01.2013 по 30.06.2015)).

**Б.3.1.3 Оценка качества первой среды**

Определение селективности и продуктивности питательной среды необходимо проводить согласно

[ГОСТ ISO 11133](kodeks://link/d?nd=1200093431&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ ISO 11133-2-2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по ...’’Статус: недействующий).

**Б.3.2 Вторая селективная среда для посева\***

**Б.3.2.1 Оксфорд агар (Oxford agar)**

Б.3.2.1.1 Основа среды

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| пептон | 23,0 г |
| крахмал | 1,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| эскулин | 1,0 г |
| цитрат аммонийного железа (III) | 0,5 г |
| хлорид лития | 15,0 г |
| агар | 9,0–18,0 г\* |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

\* В зависимости от плотности среды.

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде при нагревании.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,0 ± 0,2). Разливают основу среды в колбы или флаконы соответствующего объема и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Б.3.2.1.2 Раствор селективной добавки

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| циклогексимид | 400,0 мг |
| сульфат колистина (полимиксин Е) | 20,0 мг |
| гидрохлорид акрифлавина | 5,0 мг |
| цефотетан | 2,0 мг |
| фосфомицин | 10,0 мг |
| этанол | 5,0 см3 |
| дистиллированная вода | 5,0 см3 |

Приготовление.

Компоненты добавки растворяют в смеси этанола и воды. Стерилизуют раствор фильтрованием.

Б.3.2.1.3 Готовая среда

Приготовление:

В расплавленную и охлажденную на водяной бане до температуры (47 ± 2) °С основу среды (см. Б.3.2.1.1) добавляют, тщательно перемешивая, раствор селективной добавки (см. Б.3.2.1.2).

В стерильные чашки Петри разливают свежеприготовленную готовую среду приблизительно по 15–20 см3 и дают агару затвердеть.

Непосредственно перед применением среда в чашках должна быть подсушена в соответствии с

[ГОСТ ISO 11133](kodeks://link/d?nd=1200093430&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ ISO 11133-1-2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие ...’’Статус: недействующий  (действ. с 01.01.2013 по 30.06.2015)).

**Б.3.2.2 Палкам агар (PALCAM agar)**

Б.3.2.2.1 Основа среды

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| пептон | 23,0 г |
| крахмал | 1,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| дрожжевой экстракт | 3,0 г |
| D-глюкоза | 0,5 г |
| D-маннитол | 10,0 г |
| эскулин | 0,8 г |
| цитрат аммонийного железа (III) | 0,5 г |
| феноловый красный | 0,08 г |
| хлорид лития | 15,0 г |
| агар | 9,0–18,0 г\* |
| дистиллированная вода | 960,0 см3 |

\* В зависимости от плотности среды.

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде при нагревании.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,2±0,2). Разливают основу среды в колбы или флаконы соответствующего объема и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Б.3.2.2.2 Раствор полимиксин В сульфата

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| полимиксина В сульфат (100000 е.а.) | 0,1 г |
| дистиллированная вода | 100 см3 |

Приготовление.

Растворяют полимиксин В сульфат в воде. Стерилизуют раствор фильтрованием.

Б.3.2.2.3 Раствор акрифлавин гидрохлорида

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| акрифлавин гидрохлорид | 0,05 г |
| дистиллированная вода | 100 см3 |

Приготовление.

Растворяют акрифлавин гидрохлорид в дистиллированной воде. Стерилизуют раствор фильтрованием.

Б.3.2.2.4 Раствор пентагидрата цефтазидима натрия

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| пентагидрат цефтазидима натрия | 0,116 г |
| дистиллированная вода | 100 см3 |

Приготовление.

Растворяют пентагидрат цефтазидим натрия в воде. Стерилизуют раствор фильтрованием.

Б.3.2.2.5 Готовая среда

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| основа агара (В.3.3.1) | 960,0 см3 |
| раствор сульфата полимиксина В (В.3.3.2) | 10,0 см3 |
| раствор акрифлавина гидрохлорида (В.3.3.3) | 10,0 см3 |
| раствор пентагидратацефтазидима натрия (В.3.3.4) | 20,0 см3 |

Приготовление.

В расплавленную и охлажденную на водяной бане до (47 ± 2 ) °С основу среды (см. Б.3.2.2.1), добавляют, тщательно перемешивая, растворы добавок (см. Б.3.2.2.2-Б.3.2.2.3).

В стерильные чашки Петри разливают свежеприготовленную готовую среду приблизительно по 15–20 см3 и дают агару затвердеть.

Непосредственно перед применением среда в чашках должна быть подсушена в соответствии с

[ГОСТ ISO 11133](kodeks://link/d?nd=1200093430&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ ISO 11133-1-2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие ...’’Статус: недействующий  (действ. с 01.01.2013 по 30.06.2015)).

**Б.3.2.3 Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ)**

Б.3.2.3.1 Основа среды

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Состав: | |  |
| гидролизат казеина панкреатический | | 10,0 г |
| гидролизат рыбной муки панкреатический | | 15,0 г |
| гидролизатавтолизованных дрожжей | | 2,0 г |
| хлорид натрия | | 3,5 г |
| хлорид лития | | 15,0 г |
| цитрат аммонийного железа | | 0,5 г |
| эскулин | | 0,8 г |
| агар | | 13,0 г |
| дистиллированная вода | до 1000,0 см3 | |

Приготовление.

Компоненты растворяют в дистиллированной воде при нагревании и тщательно перемешивают до полного растворения. Устанавливают рН (7,0 ± 0,2) ед. рН и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Б.3.2.3.2 Раствор селективной добавки

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| налидиксовая кислота | 20 мг |
| акрифлавин гидрохлорида | 10 мг |
| полимиксин В сульфат | 10 мг |
| стерильная дистиллированная вода | 10 см3 |

Приготовление.

Налидиксовую кислоту, акрифлавин и полимиксин В сульфат растворяют в стерильном физиологическом растворе.

Б.3.2.3.3 Готовая среда

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| основа среды (см. Б.3.2.3.1) | 1000 см3 |
| раствор селективной добавки (см. Б.3.2.3.2) | 4,44 см3 |

Приготовление.

К расплавленной основе среды добавляют с соблюдением правил асептики раствор селективной добавки. Готовую среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят не более двух суток в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Б.3.2.4 Бриллианс Listeria агар (BRILLIANCE LISTERIA agar)

Б.3.2.4.1 Основа среды

Состав:

|  |  |
| --- | --- |
| пептон | 18,5 г |
| дрожжевой экстракт | 4,0 г |
| хлорид натрия | 9,5 г |
| пируват натрия | 2,0 г |
| хлорид лития | 15,0 г |
| мальтоза | 4,0 г |
| 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-ß-D-глюкопиранозид | 0,2 г |
| агар | 14,0 г |
| дистиллированная вода | 930 см3\* |

\* 925 см3, если используют раствор амфотерицина В.

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют при нагревании в дистиллированной воде.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,2 ± 0,2) ед. рН. Разливают основу среды в колбы или флаконы соответствующего объема и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Б.3.2.4.2 Растворы селективных добавок

Б.3.2.4.2.1 Раствор налидиксовой кислоты

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| натриевая соль налидиксовой кислоты | 0,02 г |
| гидроксида натрия, 0,05 моль/дм3 раствор | 5,0 см3 |

Приготовление

Натриевую соль налидиксовой кислоты растворяют в 5 см3 0,05 моль/дм3  раствора гидроксида натрия и стерилизуют раствор путем фильтрования.

Б.3.2.4.2.2 Раствор цефтазидима

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| цефтазидим | 0,02 г |
| дистиллированная вода | 5,0 см3 |

Приготовление.

Цефтазидим растворяют в 5 см3 дистиллированной воды и стерилизуют раствор путем фильтрования через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм.

Б.3.2.4.2.3 Раствор полимиксин В сульфата

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| полимиксин В сульфат | 76700,0 е.а. |
| дистиллированная вода | 5,0 см3 |

Приготовление.

Полимиксин В сульфат растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм.

Б.3.2.4.3 Растворы антибиотиков

Б.3.2.4.3.1 Раствор циклогексимида

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| циклогексимид | 0,05 г |
| этанол | 2,5 см3 |
| дистиллированная вода | 2,5 см3 |

Приготовление.

Циклогексимид растворяют в 2,5 см3 этанола, затем добавляют 2,5 см3 дистиллированной воды и стерилизуют раствор путем фильтрования через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм.

Б.3.2.4.3.2 Раствор амфотерицина В (используют, как альтернативу для раствора циклогексимида)

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| амфотерицин В | 0,01 г |
| соляная кислота, 1 моль/дм3 раствор | 2,5 см3 |
| диметилформамид (DMF) | 7,5 см3 |

Приготовление.

Амфотерицин растворяют в растворе соляной кислоты и диметилформамида (DMF) и стерилизуют раствор путем фильтрования через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм.

**Предупреждение** – Раствор соляной кислоты и диметилформамид (DMF) очень токсичны. Обращаться с осторожностью.

Б.3.2.4.4 Дифференциальная добавка

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| L--фосфатидилинозитал (Sigma Р 6636)\* | 2,0 г |
| холодная дистиллированная вода | 50,0 см3 |

\* Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Приготовление.

L--фосфатидилинозитал (Sigma P 6636) растворяют в холодной дистиллированной воде. Раствор перемешивают в течение 30 мин до получения гомогенной суспензии. Автокларируют при температуре 121 °С в течение 15 мин с последующим охлаждением до температуры (47 ± 2) °С.

Б.3.2.4.5 Готовая среда

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| основа среды (см. Б.3.1.2.1) | 933,0 см3\* |
| раствор налидиксовой кислоты (см. Б.3.1.2.2.1) | 5,0 см3 |
| раствор цефтазидима (см. Б.3.1.2.2.2) | 5,0 см3 |
| раствор полимиксин В сульфата (см. Б.3.1.2.2.3) | 5,0 см3 |
| раствор циклогексимида (см. Б.3.1.2.3.1) | 5,0 см3 |
| или амфотерицина В (см. Б.3.1.2.3.2) | 10,0 см3 |
| дифференциальная добавка (см. Б.3.1.2.4) | 50,0 см3 |

\* 925 см3, если используют раствор амфотерицина В.

Приготовление.

В расплавленную и охлажденную на водяной бане до температуры (47 ± 2) °С основу среды (см. Б.3.1.2.1) добавляют растворы ингибиторов (см. Б.3.1.2.2.1, Б.3.1.2.2.2, Б.3.1.2.2.3), антибиотика (см. Б.3.1.2.3) и дифференциальную добавку (см. Б.3.1.2.4), тщательно перемешивая после каждого добавления.

рН готовой среды должен составлять (7,2 ± 0,2) ед. рН.

Готовая среда должна быть гомогенной и непрозрачной.

В стерильные чашки Петри разливают свежеприготовленную готовую среду приблизительно по 15–20 см3 и дают агару затвердеть.

Непосредственно перед применением среда в чашках должна быть подсушена в соответствии с ГОСТ ISO 11133.

**Б.4 Питательные среды, используемые для изучения культурально-морфологических свойств**

**Б.4.1 Плотные питательные среды**

**Б.4.1.1 Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA)**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| триптон или панкреатическийгидролизат казеина | 17,0 г |
| соевый пептон | 3,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| калий фосфорнокислый двузамещенный | 2,5 г |
| глюкоза | 2,5 г |
| дрожжевой экстракт | 6,0 г |
| агар | 9,0–18,0 г\* |
| дистиллированная вода | 1000,0 см |

\* В зависимости от плотности среды.

Приготовление.

Растворяют компоненты или сухую готовую среду в дистиллированной воде, нагревая. При необходимости установить рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,3 ±0 ,2) ед. рН при температуре 25 °С. Среду необходимого объема разливают в пробирки. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. Скашивают агар. Для приготовления чашек с агаром готовую среду разливают в стерильные чашки Петри в объеме, необходимом для проведения теста. Дают агару застыть.

**Б.4.1.2 Трипказо-соевый агар (TSA)**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| триптон | 15,0 г |
| соевый пептон | 5,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| агар | 5,0 г |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

Приготовление.

Растворяют компоненты или сухую готовую среду в дистиллированной воде, нагревая. Устанавливают рН (7,3 ± 0,2) ед. рН и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

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

**Б.4.1.3 Мясопептонный агар (МПА)**

Готовят по

[ГОСТ 10444.1](kodeks://link/d?nd=1200021065&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и ...’’(утв. постановлением Госстандарта СССР от 17.01.1984)Применяется с 01.07.1985 ...Статус: действующая редакцияПрименяется для целей технического регламента) (пункт 5.12).

**Б.4.2 Жидкие питательные среды**

**Б.4.2.1 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB)**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| триптон или панкреатический гидролизат казеина | 17,0 г |
| соевый пептон | 3,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| калий фосфорнокислый двузамещенный | 2,5 г |
| глюкоза | 2,5 г |
| дрожжевой экстракт | 6,0 г |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, при необходимости нагревая. Устанавливают рН (7,3 ± 0,2) ед. рН. Среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °Св течение 15 мин.

**Б.4.2.2 Трипказо-соевый бульон (TSB)**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| триптон | 17,0 г |
| соевый пептон | 3,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| калий фосфорнокислый однозамещенный | 2,5 г |
| декстроза | 2,5 г |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, при необходимости нагревая. Устанавливают рН (7,3 ± 0,2) ед. рН. Среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

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

**Б.4.2.3 Мясопоптонный бульон (МПБ)**

Готовят по

[ГОСТ 10444.1](kodeks://link/d?nd=1200021065&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и ...’’(утв. постановлением Госстандарта СССР от 17.01.1984)Применяется с 01.07.1985 ...Статус: действующая редакцияПрименяется для целей технического регламента) (пункт 5.12).

**Б.5 Среда для определения ᵝ-гемолитической активности**

**Б.5.1 Кровяной агар**

**Б.5.1.1 Основа среды (вариант 1)**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| мясной пептон | 15,0 г |
| печеночный перевар | 2,5 г |
| дрожжевой экстракт | 5,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| агар | 9,0–18,0 г \* |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

\* В зависимости от плотности среды.

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, нагревая на водяной бане. При необходимости установить рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,2 ± 0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Среду разливают в колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

**Б.5.1.2 Основа среды (вариант 2)**

Состав и приготовление согласно

[ГОСТ 10444.1](kodeks://link/d?nd=1200021065&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и ...’’(утв. постановлением Госстандарта СССР от 17.01.1984)Применяется с 01.07.1985 ...Статус: действующая редакцияПрименяется для целей технического регламента) (пункт 5.12).

**Б.5.1.3 Дефибринированная кровь барана**

Приготовление.

В стерильную колбу со стеклянными бусами вливают 8 см3 только что взятой крови барана и непрерывно встряхивают в течение 10–15 мин, в результате чего находящийся в крови фибрин выпадает в осадок, обволакивая бусы. Дефибринированную кровь сливают в другую колбу или пробирку. Слитая дефибринированная кровь утрачивает способность свертываться и может храниться при температуре (4 ± 1) °С в течение одной недели.

**Б.5.1.4 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| основа среды (см. Б.5.1 или Б.5.2) | 100 см3 |
| дефибринированная кровь барана | 5,0–7,0 см3 |

Приготовление.

В основу среды (см. Б.5.1 или Б.5.2), охлажденную на водяной бане до температуры (47 ± 2) °С, добавляют дефибринированную кровь барана (см. Б.5.1.3). Среда должна иметь рН (7,2 ± 0,2) ед. рН.

Готовую среду осторожно перемешивают и разливают в чашки Петри (не более 10 см3 на чашку) и после затвердения агара подсушивают его при температуре (47 ± 2) °С в течение 30 мин или в ламинарном боксе в течение 1–2 ч или в других условиях, обеспечивающих испарение конденсационной влаги и исключающих микробное загрязнение.

Среду в чашках хранят при температуре (4 ± 1) °С не более двух суток.

Слой агара в чашке Петри должен быть равномерно окрашен в красный цвет. Для посева должна использоваться подсушенная среда.

**Б.6 Суспензия из эритроцитов барана для определения гемолитической активности**

Приготовление.

Кровь из яремной вены барана отбирают в стерильную банку с бусами и дефибринируют (см. Б.5.1.3). Эритроциты трижды отмывают изотоническим раствором хлорида натрия путем центрифугирования при 1000–2000 об/мин в течение 5–10 мин соответственно. После последнего центрифугирования надосадочная жидкость должна быть прозрачной. Красный цвет жидкости (гемолиз) свидетельствует о непригодности эритроцитов к применению. Отмытые эритроциты барана необходимо хранить при температуре (3 ± 2) °С не более двух суток.

Если гемолиз эритроцитов барана не наблюдается, необходимо внести 2 см3 кровяных телец в 98 см3 фосфатно-солевого буфера (PBS) (см. Б.11).

Если гемолиз эритроцитов наблюдается, необходимо внести около 4 см3 слоя кровяных телец в 10 см фосфатно-солевого буфера (PBS) (см. Б.11) и осторожно перемешать, а затем центрифугировать. Если жидкость на поверхности стала четко красного цвета благодаря выраженному гемолизу, не допускается использование такой суспензии эритроцитов, она должна утилизироваться.

Суспензию эритроцитов барана необходимо хранить при температуре (3 ± 2) °С не более пяти суток.

**Б.7 Среды для определения ферментативных свойств**

**Б.7.1 Бульон с бромкрезоловымпурпурным**

**Б.7.1.1 Основа среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| протеозный пептон | 10,0 г |
| мясной экстракт | 1,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| бромкрезоловый пурпурный | 0,02 г |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (6,8 ± 0,2) ед. рН. Разливают среду в пробирки соответствующего объема и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Б.7.1.2 Растворы углеводов**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| углевод\* | 5,0 г |
| дистиллированная вода | 100 см3 |

\* L-рамноза, D-ксилоза и альфа-метил-D-маннозид (Methyl-D-mannopyranoside).

Приготовление.

Каждый из углеводов отдельно растворяют в 100 см3 дистиллированной воды и стерилизуют раствор путем фильтрования.

**Б.7.1.3 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| основа среды (см. Б.7.1.1) | 9,0 см3 |
| углевод (см. Б.7.1.2) | 1,0 см3 |

Приготовление.

В асептических условиях в основу среды (см. Б.7.1) перед применением добавляют раствор каждого углевода (см. Б.7.2) в отдельности.

**Б.7.2 Среды Гисса**

Состав и приготовление в соответствии с

[ГОСТ 10444.1](kodeks://link/d?nd=1200021065&point=mark=000000000000000000000000000000000000000000000000007D20K3"\o"’’ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и ...’’(утв. постановлением Госстандарта СССР от 17.01.1984)Применяется с 01.07.1985 ...Статус: действующая редакцияПрименяется для целей технического регламента).

Углеводы: L-рамноза, D-ксилоза.

**Б.8 Агар для определения подвижности культуры микроорганизма**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| Ферментативный гидропизат казеина | 20,0 г |
| пептон | 6,1 г |
| агар-агар | 3,5 г |
| дистиллированная вода | 1000,0 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде при нагревании.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,3 ± 0,2) ед. рН. Разливают среду в пробирки соответствующего объема в количестве 5 см3 и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Б.9 Среды для проведения КАМП-теста (CAMP)**

Для проведения КАМП-тестамогут быть использованы чашки Петри с кровяным агаром (см. Б.5.1.4), но предпочтительнее использовать чашки с двойным слоем: среды (см. Б.5.1.1 или Б.5.1.2) и тонкого слоя кровяного агара (см. Б.5.1.4).

Среду (см. Б.5.1.1 или Б.5.1.2) разливают примерно по 10 см3 в стерильные чашки Петри и дают застыть. Затем очень тонким слоем заливают кровяной агар (см. Б.5.1.4), но не более 3 см3 на чашку. Дают агару застыть.

Если кровяной агар (см. Б.5.1.4) вносится в заранее приготовленные чашки со средой (см. Б.5.1.1 или Б.5.1.2), то перед тем, как внести ее, необходимо прогреть эти чашки в течение 20 мин в термостате при температуре 37 °С.

**Б.10 Среда для определения лецитиназной активности**

**Б.10.1 Лецитин-агар с активированным углем**

**Б.10.1.1 Основа среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| панкреатическийгидролизат рыбной муки | 15,0 г |
| панкреатическийгидролизат казеина | 10,0 г |
| экстракт дрожжевой | 2,0 г |
| натрий хлорид | 3,5 г |
| глюкоза | 1,0 г |
| агар | 10,0±2,0 г |
| дистиллированная вода | 1000 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, кипятят в течение 2 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные колбы и флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Б.10.1.2 Активированный уголь**

Активированный уголь растирают до порошкообразного состояния.

**Б.10.1.3 Эмульсия яичного желтка**

Поверхность яйца обрабатывают этиловым спиртом, стерильным пинцетом пробивают с двух сторон отверстия и через одно из них полностью удаляют белок. Желток выливают в стерильную колбу.

Для приготовления желточной эмульсии к одному желтку с соблюдением правил асептики добавляют 150 см3 стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают до получения однородной массы.

**Б.10.1.4 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| основа среды (см. Б.10.1) | 100 см3 |
| активированный уголь (см. Б.10.2) | 0,5 г |
| желточная эмульсия (см. Б.10.3) | 5 см3 |

Приготовление.

Расплавленную основу среды (см. Б.10.1) охлаждают до температуры (47±2,0) °С, добавляют активированный уголь (см. Б.10.2) и желточную эмульсию (см. Б.10.3), тщательно перемешивают и разливают по (20 ± 5) см3 в стерильные чашки Петри и после застывания подсушивают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (40 ± 5) мин.

**Б.10.2 Лецитин-агар без угля**

**Б.10.2.1 Основа среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| панкреатическийгидролизат рыбной муки | 15,0 г |
| панкреатическийгидролизат казеина | 10,0 г |
| экстракт дрожжевой | 2,0 г |
| натрий хлорид | 3,5 г |
| глюкоза | 1,0 г |
| агар | (10,0 ± 2,0) г |
| дистиллированная вода | 1000 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде, кипятят в течение 2 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные колбы и флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Б.10.2.2 Эмульсия яичного желтка**

Поверхность яйца обрабатывают этиловым спиртом, стерильным пинцетом пробивают с двух сторон отверстия и через одно из них полностью удаляют белок. Желток выливают в стерильную колбу.

Для приготовления желточной эмульсии к одному желтку с соблюдением правил асептики добавляют 150 см3 стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS) (см. Б.11) и тщательно перемешивают до получения однородной массы.

**Б.10.2.3 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| основа среды (см. Б.10.2.1) | 100 см3 |
| желточная эмульсия (см. Б.10.2.2) | 5 см3 |

Приготовление.

Расплавленную основу среды (см. Б.10.2.1) охлаждают до температуры (47 ± 2,0) °С, добавляют желточную эмульсию (см. Б.10.2.2), тщательно перемешивают и разливают по (20 ± 5) см3 в стерильные чашки Петри и после застывания подсушивают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (40 ± 5) мин.

**Б.10.3 Среда и реактивы для реакции Фогеса-Проскауэра (VP)**

Б.10.3.1 Среда для реакции Фогеса-Проскауэра (VP)

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| протеозный пептон | 7,0 г |
| хлорид натрия | 5,0 г |
| глюкоза | 5,0 г |
| дистиллированная вода | 1000 см3 |

Приготовление.

Компоненты растворяют в дистиллированной воде, нагревая при необходимости.

Устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение составляло (6,9 ± 0,2) ед. рН при 25 ° С. Разливают среду в пробирки по 3 см3 и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Б.10.3.2 Спиртовой раствор α-нафтола

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| α-нафтол | 5,0 г |
| Этанол, 96 % (объемная доля) | 100 см3 |

Приготовление.

Растворяют α-нафтол в этаноле.

Б.10.3.3 Раствор гидроксида калия

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| гидроксид калия | 40,0 г |
| дистиллированная вода | 100 см3 |

Приготовление.

Растворяют гидроксид калия в дистиллированной воде.

**Б.11 Фосфатно-солевой буфер (PBS)**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| натрий фосфорнокислый двухзамещенный | 8,98 г |
| натрий фосфорнокислый однозамещенный | 2,71 г |
| хлорид натрия | 8,5 г |
| дистиллированная вода | 1000,0 см |

Приготовление.

Компоненты растворяют в дистиллированной воде. При необходимости установить рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,2 ± 0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Б.12 Универсальный нейтрализатор**

**Б.12.1 Основа среды**

Состав:

|  |  |
| --- | --- |
| пептон | 1,0 г |
| хлорида натрия | 8,5 г |
| дистилированная вода | 1000 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде.

**Б.12.2 Готовая среда**

|  |  |
| --- | --- |
| Основа среды | 1000 см3 |
| сорбитан монолеат | 30,0 г |
| лецитин | 3,0 г |
| тиосульфат натрия | 5,0 г |
| гистидин | 1,0 г |
| сапонин | 30,0 г |

Приготовление.

Компоненты растворяют в основе среды. Готовый раствор разливают в пробирки или бутылки и стерилизуют в течение 15 мин при температуре 121 °С.

П р и м е ч а н и е – Допускается применение других нейтрализаторов или их комбинаций в отношении известного дезинфицирующего средства.

**Б.13 Пептонная вода**

|  |  |
| --- | --- |
| Состав среды: |  |
| пептон | 10,0 г |
| хлористый натрий | 5,0 г |
| фосфорнокислый натрий двузамещенный 12-водный | 9,0 г |
| фосфорнокислый калий однозамещенный | 1,5 г |
| дистиллированная вода | 1000 см3 |

Приготовление.

Компоненты или сухую готовую среду растворяют в дистиллированной воде. При необходимости установить рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,0 ± 0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

**Приложение В**

**(обязательное)**

**Схема отбора проб смывов и подготовки их**

**к проведению исследований**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вид материала для взятия  смывов | Площадь  (S, cм2) | Объем (см3) селективной среды первичного обогащения | |
| Низкая контаминация исследуемой  поверхности | Высокая контаминация  исследуемой  поверхности |
| Губка,  ткань | ≥100 | 100 | 225 |
| Тампон | ≤100 | 10 | |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

УДК 663/664:543.9:006.354 МКС 07.100.30

Ключевые слова: пищевые продукты, бактерии рода *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, селективное обогащение, идентификация \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Разработчики стандарта:

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

Директор О.А. Кузнецова

Заместитель директора

по научной работе А.А. Семенова

Руководитель отдела «Технического

регулирования и систем управления

качеством» З.А. Юрчак

Руководитель лаборатории Ю.К. Юшина

Ведущий научный сотрудник Д.С. Батаева

Младший научный сотрудник Е.В. Зайко