

Российская академия наук  
Отделение сельскохозяйственных наук РАН  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт  
ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Пермская государственная сельскохозяйственная академия  
имени академика Д.Н. Прянишникова»

«УТВЕРЖДАЮ»

Академик-секретарь Отделения сельско-  
хозяйственных наук РАН

академик РАН

  
« 20 » \_\_\_\_\_ 2017 г.



## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ В МЯСЕ И МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

*Методические рекомендации*

Пермь  
ИПЦ «Прокростъ»  
2017

УДК 619:637.5.04/.07

ББК 48

Ч-837

*Рецензенты:*

К.А. Сидорова, доктор биологических наук, профессор, директор института биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «ГАУ Северного Зауралья»;

Н.К. Пелевина, заместитель директора ГБУВК «Пермский ветеринарный диагностический центр»

*Авторы:* Е.О. Чугунова, доцент, кандидат ветеринарных наук; Н.А. Татарникова, заведующая кафедрой инфекционных болезней, доктор ветеринарных наук, профессор

**Ч-837 Чугунова, Е.О.**

Методы определения сальмонелл в мясе и мясных продуктах : методические рекомендации / Е.О. Чугунова, Н.А. Татарникова; М-во с.-х. РФ, федеральное гос. бюджетное образов. учреждение высшего образования «Пермская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д.Н. Прянишникова». – Пермь : ИПЦ «Прокрость», 2017. – 30 с. ISBN 978-5-94279-347-0

Методические рекомендации содержат описание способов и определяют порядок испытаний проб мяса и мясных продуктов.

Методические рекомендации предназначены для специалистов бактериологических отделов, центров и лабораторий, осуществляющих испытания пищевых продуктов животного происхождения.

**УДК 619:637.5.04/.07**

**ББК 48**

Методические рекомендации «Методы определения сальмонелл в мясе и мясных продуктах» рассмотрены и одобрены методической комиссией «Ветеринарная санитария, гигиена и экология» секции зоотехнии и ветеринарии Отделения сельскохозяйственных наук РАН (протокол № 2 от 05 июня 2017 года).

**ISBN 978-5-94279-347-0**

© ИПЦ «Прокрость», 2017

© Чугунова Е.О., 2017

© Татарникова Н.А., 2017

## Содержание

1. Область применения.....	5
2. Нормативные ссылки.....	5
3. Термины и определения.....	6
4. Принцип методики.....	7
5. Испытательное оборудование.....	8
6. Реактивы.....	8
7. Отбор проб и приготовление образцов.....	10
8. Проведение испытаний.....	11
8.1. Ускоренный способ определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и сальмонеллезных бактериофагов.....	11
8.2. Определение бактерий рода <i>Salmonella</i> по ГОСТ 31659-2012 с использованием модифицированной забуференной пептонной воды.....	13
8.3. Ускоренный способ определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и среды Раппопорта–Вассилиадиса (среда MSRV), с новобиоцином.....	15
8.4. Ускоренный способ определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и ИФА-экспресс-теста Singlepath®- <i>Salmonella</i> .....	15
8.5. Ускоренный способ определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	16
9. Оценка результатов испытаний.....	17
9.1. Оценка результатов ускоренного способа определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и сальмонеллезных бактериофагов.....	17
9.2. Оценка результатов определения бактерий рода <i>Salmonella</i> по ГОСТ 31659-2012 с использованием модифицированной забуференной пептонной воды.....	18
9.3. Оценка результатов ускоренного способа определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и среды Раппопорта–Вассилиадиса (среда MSRV), с новобиоцином.....	20

9.4. Оценка результатов ускоренного способа определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и ИФА-экспресс-теста Singlepath®- <i>Salmonella</i> .....	21
9.5. Оценка результатов ускоренного способа определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	22
<i>Приложение А.</i> Схема ускоренного определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и сальмонеллезных бактериофагов.....	23
<i>Приложение Б.</i> Схема постановки фагоидентификации сальмонелл.....	24
<i>Приложение В.</i> Схема определения бактерий рода <i>Salmonella</i> по ГОСТ 31659-2012 с использованием модифицированной забуференной пептонной воды.....	25
<i>Приложение Г.</i> Схема определения бактерий рода <i>Salmonella</i> ускоренным способом с применением модифицированной забуференной пептонной воды и среды Раппопорта– Вассилиадиса (среда MSR <sub>V</sub> ), с новобиоцином.....	26
<i>Приложение Д.</i> Схема определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и ИФА-экспресс-теста Singlepath®- <i>Salmonella</i> .....	27
<i>Приложение Е.</i> Схема определения бактерий рода <i>Salmonella</i> с применением модифицированной забуференной пептонной воды и полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	28
<i>Приложение Ж.</i> Состав и приготовление питательной среды и реактива для первого этапа испытаний пищевой продукции.....	29
<i>Приложение З.</i> Интерпретация биохимических тестов.....	30

## 1. Область применения

Методические рекомендации распространяются на исследования мяса и мясных продуктов и устанавливают способ выявления в определенной массе продукта бактерий рода *Salmonella* (кроме серотипа *Salmonella Choleraesuis*).

Методика может быть применима в качестве самостоятельного способа определения наличия бактерий рода *Salmonella* в испытуемом продукте (п. 8.1. настоящих методических рекомендаций) или в сочетании с любым из существующих на сегодняшний день официально рекомендованных способов определения данных бактерий (пп. 8.2. – 8.5 настоящих методических рекомендаций).

## 2. Нормативные ссылки

1. ГОСТ 31659-2012 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. – Москва : Стандартинформ, 2014. – 24 с.

2. ГОСТ Р 51447-99 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб. – Москва : Стандартинформ, 2010. – 6 с.

3. ГОСТ ISO 7218-2015. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям. – Москва : Стандартинформ, 2016. – 76 с.

4. ГОСТ Р 50396.0-2013 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям. – Москва : Стандартинформ, 2014. – 24 с.

5. ГОСТ Р 51448-99 Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований. – Москва : Стандартинформ, 2010. – 8 с.

6. ГОСТ 13805-76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия. – Москва : Издательство стандартов, 1981. – 22 с.

7. ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия. – Москва : Стандартинформ, 2008. – 19 с.

8. ГОСТ 4172-76 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный. Технические условия. – Москва : Издательство стандартов, 1993. – 16 с.

9. ГОСТ 4198-75 Реактивы. калий фосфорно-кислый однозамещенный. Технические условия. – Москва : Стандартинформ, 2010. – 15 с.

10. ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия. – Москва : Стандартинформ, 2007. – 12 с.

11. ГОСТ 30425-97 Консервы. Метод определения промышленной стерильности. – Москва : Стандартинформ, 2011. – 16 с.

12. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды : методические указания: МУ 4.2.2723-10. 4.2. [Электронный ресурс]. – Режим доступа : [URL:http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/4091056/](http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/4091056/). – Загл. с экрана (дата обращения).

13. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания (МУК 4.2.2316-08). – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.

### **3. Термины и определения**

Сальмонеллы – лактозонегативные грамотрицательные палочки удлиненной формы, с закругленными концами, длиной 1...4 и шириной 0,3...0,8 мкм, образующие на агаризованных средах типичные или не совсем типичные колонии.

Серотип – группа микроорганизмов одного вида, объединяемых общей антигенной структурой, определяемой серологическими методами диагностики.

Спот-тест – образование специфичными и чувствительными бактериофагами стерильных пятен на газоне бактериальной культуры.

Тест-штаммы – стандартные штаммы микроорганизмов, на которых определяют соответствие биопрепарата стандарту при воздействии в лабораторных условиях.

#### **4. Принцип методики**

В основе методики лежит исключительная способность сальмонелл ферментировать пропиленгликоль с выделением кислоты, а также чувствительность и строгая специфичность бактериофагов.

В качестве тест-штаммов сальмонелл выбраны серотипы *S. Typhimurium* № 79, *S. Enteritidis* № 5765, *S. Gallinarum-Pullorum* № 665, *S. Dublin* № 780, *S. Choleraesuis* № 1348 из коллекции музея ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». Тест-штаммы микроорганизмов для реализации настоящей методики и контроля качества разработанной питательной среды накопления подготовлены согласно МУК 4.2.2316-08. Все штаммы прошли контроль на типичность по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам и на отсутствие диссоциации.

Для реализации настоящей методики использованы суточные агаровые культуры тест-штаммов микроорганизмов. Исходная бактериальная суспензия, содержащая  $10^8$  МТ/см<sup>3</sup>, подготовлена с помощью оптического прибора Densi-Lameter (Erba Lachema, Чехия). Далее выполнен ряд последовательных разведений до получения суспензии, содержащей  $10^1$  МТ/см<sup>3</sup>.

Чувствительность и специфичность тест-штаммов сальмонелл к бактериофагам определена с помощью спот-теста.

## **5. Испытательное оборудование**

- 5.1. Амплификатор (только для п. 8.5.2.).
- 5.2. Бактериологическая петля диаметром около 3 мм.
- 5.3. Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г (для взвешивания реактивов) с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более  $\pm 0,01$  мг.
- 5.4. Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 1000 г (для взвешивания продукта) с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более  $\pm 20,0$  мг.
- 5.5. Водяная баня, поддерживающая температуру 100,0 °С (только для пп.8.4.2.; 8.5.2.).
- 5.6. Детектор флуоресцентный (только для п. 8.5.2.).
- 5.7. рН-метр с точностью калибровки  $\pm 0,1$  рН при температуре 20 °С – 25 °С по ГОСТ ISO 7218.
- 5.8. Стекла предметные по ГОСТ 9284-75.
- 5.9. Стерилизационный сушильный шкаф или автоклав по ГОСТ ISO 7218.
- 5.10. Термостат твердотельный универсальный (только для п. 8.5.2.).
- 5.11. Термостат, поддерживающий температуру (37 $\pm$ 1) °С по ГОСТ ISO 7218.
- 5.12. Флаконы и пробирки соответствующего объема.
- 5.13. Центрифуга для ПЦР-планшетов (только для п. 8.5.2.).

## **6. Реактивы**

- 6.1. 1-нафтол.
- 6.2. L-лизиндекарбоксилазная среда.
- 6.3. Агар Кристенсена.



- 6.4. Висмут-сульфит агар (среда Плоскирева, среда Эндо, среда Левина, бриллиантовый зеленый агар).
- 6.5. Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.
- 6.6. Глюкоза по ГОСТ 975-88.
- 6.7. Калий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 2493-75, ч. или х.ч. или ч.д.а.
- 6.8. Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198-75, ч. или х.ч. или ч.д.а.
- 6.9. Калия гидроокись по ГОСТ 24363-80, ч. или х.ч. или ч.д.а.
- 6.10. Креатин моногидрат.
- 6.11. Ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар).
- 6.12. Мясо-пептонный агар.
- 6.13. Натрий фосфорнокислый 12-водный двузамещенный по ГОСТ 4172-76, ч. или х.ч. или ч.д.а.
- 6.14. Натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245-76, ч. или х.ч. или ч.д.а.
- 6.15. Натрий хлористый по ГОСТ 4233-77, ч. или х.ч. или ч.д.а.
- 6.16. Натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77, ч. или х.ч. или ч.д.а.
- 6.17. О-нитрофенил  $\beta$ -D-галактопиранозид (ONPG).
- 6.18. Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805-76.
- 6.19. Полужидкий агар.
- 6.20. Пропиленгликоль (пропандиол-1,2 «чистый»).
- 6.21. Протейный поливалентный бактериофаг (если имеется предположение, что испытуемая проба может быть контаминирована бактериями рода *Proteus*).
- 6.22. Реактив Ковача или Эрлиха.
- 6.23. Сальмонеллезный поливалентный бактериофаг (только для фагодиагностики).
- 6.24. Селенитовый бульон или тетратионатный бульон Мюллер-Кауфмана.

- 6.25. Спирт этиловый 96 %.
- 6.26. Среда Раппапорта-Вассилиадиса с новобиоцином (MSRV) (только для п. 8.3.2.).
- 6.27. Среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон).
- 6.28. Среды Гисса с маннитом или сахарозой.
- 6.29. Сухие агглютинирующие адсорбированные поливалентные сальмонеллезные O-, Vi- и H-сыворотки.
- 6.30. Тест-система на основе метода ПЦР для определения наличия сальмонелл в пищевых продуктах (только для п. 8.5.2.).
- 6.31. Трехсахарный железистый агар (TSI-агара) или агар Клиглера, или среда Олькеницкого.
- 6.32. Триптон/триптофановая среда, или бульона Хоттингера, или мясо-пептонный бульон с L-триптофаном.
- 6.33. Физиологический раствор.
- 6.34. Фуксин кислый, ч.
- 6.35. Экспресс-тест Singlepath®-Salmonella (только для п. 8.4.2.).

## **7. Отбор проб и приготовление образцов**

Отбор проб и подготовку для микробиологических лабораторных испытаний осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51447-99 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб; ГОСТ ISO 7218-2015. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям; ГОСТ Р 50396.0-2013 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям; ГОСТ Р 51448-99 Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований.

## 8. Проведение испытаний

### 8.1. Ускоренный способ определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и сальмонеллезных бактериофагов

Лабораторные испытания мяса и мясных продуктов с целью обнаружения бактерий рода *Salmonella* осуществляют в 3 этапа. Схема проведения испытаний приведена в приложении А.

#### 8.1.1. Обогащение в модифицированной забуференной пептонной воде

Навеску испытуемого продукта, равную 25 г поместить в 225 см<sup>3</sup> модифицированной забуференной пептонной воды с пропиленгликолем (МЗПВ). Если масса пробы иная, чем 25 г, используют необходимое количество среды, сохраняя соотношение 1:10 и проводить обогащение бактерий рода *Salmonella* при температуре (37±1) °С в течение (15±3) часов.

Для ингибирования возможно присутствующих в испытуемой пробе продукта бактерий рода *Proteus* рекомендуем в обогатительную питательную среду вносить протейный бактериофаг в объеме 2,5 см<sup>3</sup> на 225 см<sup>3</sup> среды.

8.1.1.2. По истечении указанного времени в питательную среду с испытуемыми образцами внести 1,0 см<sup>3</sup> индикатора Андрее и наблюдать за изменением цвета. В случае появления красноватого оттенка в течение 10...15 секунд и интенсивного окрашивания среды в течение 60 минут реакцию следует считать положительной, что является основанием для продолжения исследований.

8.1.1.3. При лабораторных испытаниях продуктов, содержащих значительное количество крови, визуальная оценка изменения цвета среды при внесении индикатора Андрее затруднительна. В данном случае необходимо около 20 см<sup>3</sup> питательной среды перенести в две пробирки примерно (по 10 см<sup>3</sup> в каждую) и в одну из них добавить несколько капель

индикатора Андреде. В течение 60 минут оценить изменение цвета в пробирке с индикатором, сравнивая его с цветом среды в интактной пробирке. Появление интенсивного красного оттенка среды в пробирке с индикатором служит признаком наличия бактерий рода *Salmonella* в испытуемой пробе продукта и является основанием для продолжения исследований.

Состав и способ приготовления модифицированной забуференной пептонной воды и индикатора Андреде представлены в приложении Ж.

### **8.1.2. Пересев на плотные питательные среды**

Культуры после обогащения по п. 8.1. засеять микробиологической петлей на XLD-агар и на одну из агаризованных сред: висмут-сульфит агар (ВСА), среда Плоскирева, среда Эндо, среда Левина или бриллиантовый зеленый агар. Чашки перевернуть вверх дном и инкубировать при температуре  $(37\pm 1)$  °С в течение 24...48 часов.

### **8.1.3. Идентификация**

8.1.3.1. Фагоидентификация и получение чистой агаровой культуры для серологической типизации. Схема постановки реакции фагоидентификации приведена в приложении Б.

В случае формирования типичных или не совсем типичных для сальмонелл колоний, микробиологической петлей произвести пересев материала на скошенный мясопептонный агар (МПА) для дальнейшей серотипизации сальмонелл и в три пробирки, содержащих по  $9,0 \text{ см}^3$  селенитового или RVS-бульона совместно с  $0,1 \text{ см}^3$  сальмонеллезного бактериофага для фагоидентификации. Посевы инкубировать при температуре  $(37\pm 1)$  °С или  $(41,5\pm 1)$  °С в течение  $(24\pm 3)$  часов.

### **8.1.3.2. Серологическая типизация**

Для серологической типизации использовать чистые культуры, отобранные с поверхности скошенного МПА (для

определения соматического антигена – с верхней части агара; жгутикового – с нижней части вблизи конденсационной жидкости).

Предварительно следует исключить самоагглютинирующие штаммы. Для этого поместить каплю физиологического раствора на предметное стекло и диспергировать в ней часть исследуемой колонии. В течение 30...60 сек оценить результат. Если наблюдается в разной степени склеивание бактерий, то считают, что тестируемые штаммы обладают самоагглютинацией и их не подвергают дальнейшей серологической типизации.

Серогрупповую принадлежность сальмонелл оценивать по результатам реакции агглютинации на предметном стекле, используя набор сывороток сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О-, Vi- и H-агглютинирующих. Следует работать с каждой из комплексных О-сывороток последовательно (начиная с первой) до получения положительного результата с двумя сыворотками.

## **8.2. Определение бактерий рода *Salmonella* по ГОСТ 31659-2012 с использованием модифицированной забуференной пептонной воды**

Лабораторные испытания мяса и мясных продуктов с целью обнаружения бактерий рода *Salmonella* осуществляют в 4 этапа. Схема проведения испытаний приведена в приложении В.

### **8.2.1. Обогащение в модифицированной забуференной пептонной воде**

Осуществлять по п. 8.1.1.

### **8.2.2. Обогащение в селективной жидкой среде**

По 1 см<sup>3</sup> культуры, полученной по п. 8.2.1. пересеять в 10 см<sup>3</sup> RVS-бульона и 10 см<sup>3</sup> селенитового или тетраэтилатного бульона Мюллер-Кауфмана. Посевы на RVS-бульоне инкубировать при температуре (41,5±1) °С, на селенитовом

или тетратионатном бульоне Мюллер-Кауфмана – при температуре  $(37\pm 1)$  °С в течение  $(24\pm 3)$  часов.

### **8.2.3. Пересев на плотные питательные среды**

Культуры после обогащения по п. 8.2.2. засеять микробиологической петлей на XLD-агар и на одну из агаризованных сред: висмут-сульфит агар (ВСА), среда Плоскирева, среда Эндо, среда Левина или бриллиантовый зеленый агар. Чашки перевернуть вверх дном и инкубировать при температуре  $(37\pm 1)$  °С в течение  $(24\pm 3)$  часов, а при использовании бриллиантового зеленого агара в течение 48 часов.

### **8.2.4. Идентификация**

Для биохимической и серологической идентификации использовать только чистые культуры. Из отобранных для биохимической идентификации колоний готовят мазки и окрашивают по Граму по ГОСТ 30425.

#### **8.2.4.1. Биохимическая идентификация**

Биохимическую идентификацию можно выполнять по ГОСТ 31659-2012 с использованием трехсахарного железистого агара (TSI-агара) или агара Клиглера, или среды Олькеницкого. Возможность расщепления мочевины изучить с помощью агара Кристенсена; возможность образования ацетона реакцией Фогес-Проскауера, индола с помощью триптон/триптофановой среды, или бульона Хоттингера, или мясо-пептонного бульона с L-триптофаном. Также необходимо определить  $\beta$ -галактозидазную активность, возможность образования L-лизиндекарбоксилазы, ферментации сахарозы и маннита и подвижность.

Допускается проводить биохимическую идентификацию с использованием тест-систем промышленного производства, зарегистрированных в странах, присоединившихся к стандарту, например «API 20E», «Rapid 20E», а также с помощью микробиологического анализатора, например

Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия) и набора ЭНТЕРОтест 24Н.

8.2.4.2. Серологическая идентификация

Осуществлять по п. 8.1.3.2.

### **8.3. Ускоренный способ определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и среды Раппопорта– Вассилиадиса (среда MSR<sub>V</sub>), с новобиоцином**

Лабораторные испытания мяса и мясных продуктов с целью обнаружения бактерий рода *Salmonella* осуществляют в 3 этапа. Схема проведения испытаний приведена в приложении Г.

#### **8.3.1. Обогащение в модифицированной забуференной пептонной воде**

Осуществлять по п. 8.1.1.

#### **8.3.2. Выделение колоний сальмонелл на среде MSR<sub>V</sub>**

Исследуемый образец в объеме 0,1 см<sup>3</sup> после обогащения в модифицированной забуференной пептонной воде внести в центр чашки Петри со средой MSR<sub>V</sub>, перевернуть вверх дном и инкубировать при температуре (41,5±1) °С в течение 12–18 ч.

#### **8.3.3. Идентификация**

8.3.3.1. Фагоидентификация или биохимическая идентификация

Осуществлять по п. 8.1.3.1. или п. 8.2.4.1.

8.3.3.2. Серологическая идентификация

Осуществлять по п. 8.1.3.2.

### **8.4. Ускоренный способ определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и ИФА-экспресс-теста Singlepath®-*Salmonella***

Лабораторные испытания мяса и мясных продуктов с целью обнаружения бактерий рода *Salmonella* осуществляют

в 4 этапа. Схема проведения испытаний приведена в приложении Д.

#### **8.4.1. Обогащение в модифицированной забуференной пептонной воде**

Осуществлять по п. 8.1.1.

#### **8.4.2. Выполнение экспресс-теста**

8.4.2.1. Для осуществления экспресс-теста предварительно необходимо инактивировать микроорганизмы, в том числе и бактерии рода *Salmonella*, возможно присутствующие в обогащенной пробе. Для этого 2,0 см<sup>3</sup> модифицированной забуференной пептонной воды после этапа обогащения прогреть на водяной бане при температуре 100,0 °С в течение 15 мин.

8.4.2.2. Аликвотную часть инактивированной пептонной воды в объеме 0,16 см<sup>3</sup> внести в лунку тест-планшета.

#### **8.4.3. Пересев на плотные питательные среды**

Осуществлять по п. 8.1.2.

#### **8.4.4. Идентификация**

8.4.4.1 Фагоидентификация или биохимическая идентификация

Осуществлять по п. 8.1.3.1. или п. 8.2.4.1.

8.4.4.2. Серологическая идентификация

Осуществлять по п. 8.1.3.2.

### **8.5. Ускоренный способ определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

Лабораторные испытания мяса и мясных продуктов с целью обнаружения бактерий рода *Salmonella* осуществляют в 3 этапа. Схема проведения испытаний приведена в приложении Е.

#### **8.5.1. Обогащение в модифицированной забуференной пептонной воде**

Осуществлять по п. 8.1.1.



### **8.5.2. Выполнение ПЦР**

Выявление ДНК сальмонелл в модифицированной забуференной пептонной воде проводят без последующей дополнительной обработки в соответствии с инструкцией к тест-системе.

### **8.5.3. Идентификация**

8.5.3.1. Фагоидентификация или биохимическая идентификация

Осуществлять по п. 8.1.3.1. или п. 8.2.4.1.

8.5.3.2. Серологическая идентификация

Осуществлять по п. 8.1.3.2.

## **9. Оценка результатов испытаний**

**9.1. Оценка результатов ускоренного способа определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и сальмонеллезных бактериофагов**

9.1.1. Результат первого этапа испытаний (п. 8.1.1.) считают положительным в случае изменения цвета модифицированной забуференной пептонной воды с желтого на красный при внесении индикатора Андрее и 60-минутной экспозиции при комнатной температуре.

Сохранение желтого цвета среды при внесении индикатора Андрее и после 60-минутной экспозиции при комнатной температуре свидетельствует об отсутствии бактерий рода *Salmonella* в испытуемом продукте.

9.1.2. Результат второго этапа испытаний (п. 8.1.2.) считают положительным при формировании на плотных питательных средах типичных или не совсем типичных колоний сальмонелл.

Колонии бактерий рода *Salmonella* на XLD-агаре имеют черный центр и слегка прозрачную зону красноватого цвета. На ВСА бактерии рода *Salmonella* образуют черные с харак-

терным металлическим блеском или зеленые колонии. На среде Эндо бактерии рода *Salmonella* образуют слегка розоватые прозрачные колонии. На среде Плоскирева бактерии рода *Salmonella* дают рост круглым бесцветным мутным колониям. На среде Левина обнаруживают голубые или розовато-фиолетовые колонии. На бриллиантовом зеленом агаре бактерии рода *Salmonella* образуют красноватые или розовые, почти белые колонии.

9.1.3. Результат фагоидентификации (п. 8.1.3.1.) считают положительным, если все пробирки, кроме контроля на присутствие свободного фага, остаются прозрачными, что говорит о взаимодействии естественной и высокоспецифичной системы фаг-бактерия.

Результат серотипизации (п. 8.1.3.2.) считают положительным при проявлении агглютинации в течение 30...60 секунд в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости.

## **9.2. Оценка результатов определения бактерий рода *Salmonella* по ГОСТ 31659-2012 с использованием модифицированной забуференной пептонной воды**

9.2.1. Результат первого этапа испытаний (п. 8.2.1.) оценивают по п. 9.1.1.

9.2.2. Результат третьего этапа испытаний (п. 8.2.3.) оценивают по п. 9.1.2.

9.2.3. Результаты биохимической идентификации (п. 8.2.4.1.) интерпретируют следующим образом:

9.2.3.1. Столбик среды Олькеницкого – желтый – глюкоза положительная (глюкозу ферментирует); красный или неизменившийся – глюкоза отрицательная (глюкозу не ферментирует); черный – образование сероводорода; пузырьки или разрывы – образование газа из глюкозы;

скошенная поверхность среды Олькеницкого – желтая – лактоза и/или сахароза положительные (лактозу и/или са-

харозу ферментирует); красная или неизменившаяся – лактоза и сахароза отрицательные (ни лактозу, ни сахарозу не ферментирует).

Типичные культуры бактерий рода *Salmonella* на агаре Клиглера показывают щелочную (красную) поверхность и кислый (желтый) столбик с образованием газа (пузырьков), и примерно в 90% случаев образуется сероводород (черный агар).

Если изолированы лактозоположительные бактерии рода *Salmonella*, то поверхность TSI-агара желтая. Предварительное определение культур бактерий рода *Salmonella* не может основываться только на результатах теста на TSI-агаре. Дальнейшему изучению подвергают также лактозоположительные бактерии или бактерии, не образующие сероводород, но обязательно ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа.

9.2.3.2. При расщеплении мочевины с выделением аммония (положительной реакции с агаром Кристенсена) цвет фенолового красного меняется от розового до светло-вишневого.

Бактерии рода *Salmonella* не расщепляют мочевину.

9.2.3.3. Помутнение и пурпурный цвет L-лизиндекарбоксилазной среды после инкубирования указывает на положительную реакцию. Желтый цвет указывает на отрицательную реакцию.

*Salmonella* Paratyphi A не образует L-лизиндекарбоксилазу, остальные образуют.

9.2.3.4. Желтое окрашивание, появившееся через 15-20 мин после внесения  $\beta$ -галактозидазного реактива или ONPG-диска, указывает на положительную реакцию. Бактерии рода *Salmonella*, кроме *S. Arizonae*, не обладают  $\beta$ -галактозидазой.

9.2.3.5. Появление через 15 мин от розового до светло-красного окрашивания при определении образования ацето-

ина реакцией Фогес-Проскауера указывает на положительную реакцию.

Бактерии рода *Salmonella* не образуют ацетона (реакция Фогес-Проскауера отрицательная).

9.2.3.6. Образование красного кольца при определении образования индола указывает на положительную реакцию. Желто-коричневое кольцо указывает на отрицательную реакцию.

Бактерии рода *Salmonella* не образуют индол.

9.2.3.7. Бактерии рода *Salmonella* не ферментируют сахарозу, но ферментируют маннит. При сбраживании маннита цвет среды изменяется, образуется или не образуется газ.

9.2.3.8. При росте подвижных культур отмечается диффузионный рост по всему столбику полужидкого агара, при росте неподвижных культур - вокруг места укола.

Бактерии рода *Salmonella* подвижны, кроме *S. Gallinarum-Pullorum*.

9.2.3.9. Интерпретация биохимических тестов приведена в приложении 3.

9.2.4. Результат серологической типизации (п. 8.2.4.2.) оценивают по п. 9.1.4.

**9.3. Оценка результатов ускоренного способа определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и среды Раппопорта–Вассилиадиса (среда MSR<sub>V</sub>), с новобиоцином**

9.3.1. Результат первого этапа испытаний (п. 8.3.1.) оценивают по п. 9.1.1.

9.3.2. Результат второго этапа испытаний (п. 8.3.2.) считают положительным при диффузном росте колоний в толще среды Раппопорта–Вассилиадиса (от центра к периферии), окруженных светлым ореолом, что является признаком наличия подвижных штаммов бактерий рода *Salmonella* в испытуемой пробе продукта. Рост колоний в форме пуговки может

служить признаком наличия неподвижных штаммов бактерий рода *Salmonella* (требуется дополнительная идентификация).

9.3.3. Результат фагоидентификации (п. 8.3.3.1.) оценивают по п. 9.1.3.

Результат биохимической идентификации (п. 8.3.3.1.) оценивают по п. 9.2.3.

Результат серологической типизации (п. 8.3.3.2.) оценивают по п. 9.1.4.

#### **9.4. Оценка результатов ускоренного способа определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и ИФА-экспресс-теста Singlepath®-*Salmonella***

9.4.1. Результат первого этапа испытаний (п. 8.4.1.) оценивают по п. 9.1.1.

9.4.2. Результат ИФА экспресс-теста оценивают визуально: присутствие красной линии в тестовой (Т) и контрольной (С) зонах планшета свидетельствует о наличии бактерий рода *Salmonella* в испытуемой пробе продукта (результат положительный); присутствие красной линии только в контрольной (С) зоне свидетельствует об отсутствии бактерий рода *Salmonella* в испытуемой пробе продукта (результат отрицательный).

9.4.3. Результат третьего этапа испытаний (п. 8.4.3.) считают положительным при формировании на плотных питательных средах типичных или не совсем типичных колоний сальмонелл (см. п. 9.1.2.).

9.4.4. Результат фагоидентификации (п. 8.4.4.1.) оценивают по п. 9.1.3.

Результат биохимической идентификации (п. 8.4.4.1.) оценивают по п. 9.2.3.

Результат серологической типизации (п. 8.4.4.2.) оценивают по п. 9.1.4.

**9.5. Оценка результатов ускоренного способа определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

9.5.1. Результат первого этапа испытаний (п. 8.5.1.) оценивают по п. 9.1.1.

9.5.2. Результат полимеразной цепной реакции (п. 8.5.2.) оценивают по наличию или отсутствию ДНК возбудителя в аликвотной части модифицированной забуференной пептонной воды.

9.5.3. Результат фагоидентификации (п. 8.5.3.1.) оценивают по п. 9.1.3.

Результат биохимической идентификации (п. 8.5.3.1.) оценивают по п. 9.2.3.

Результат серологической типизации (п. 8.5.3.2.) оценивают по п. 9.1.4.

Схема ускоренного определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и сальмонеллезных бактериофагов

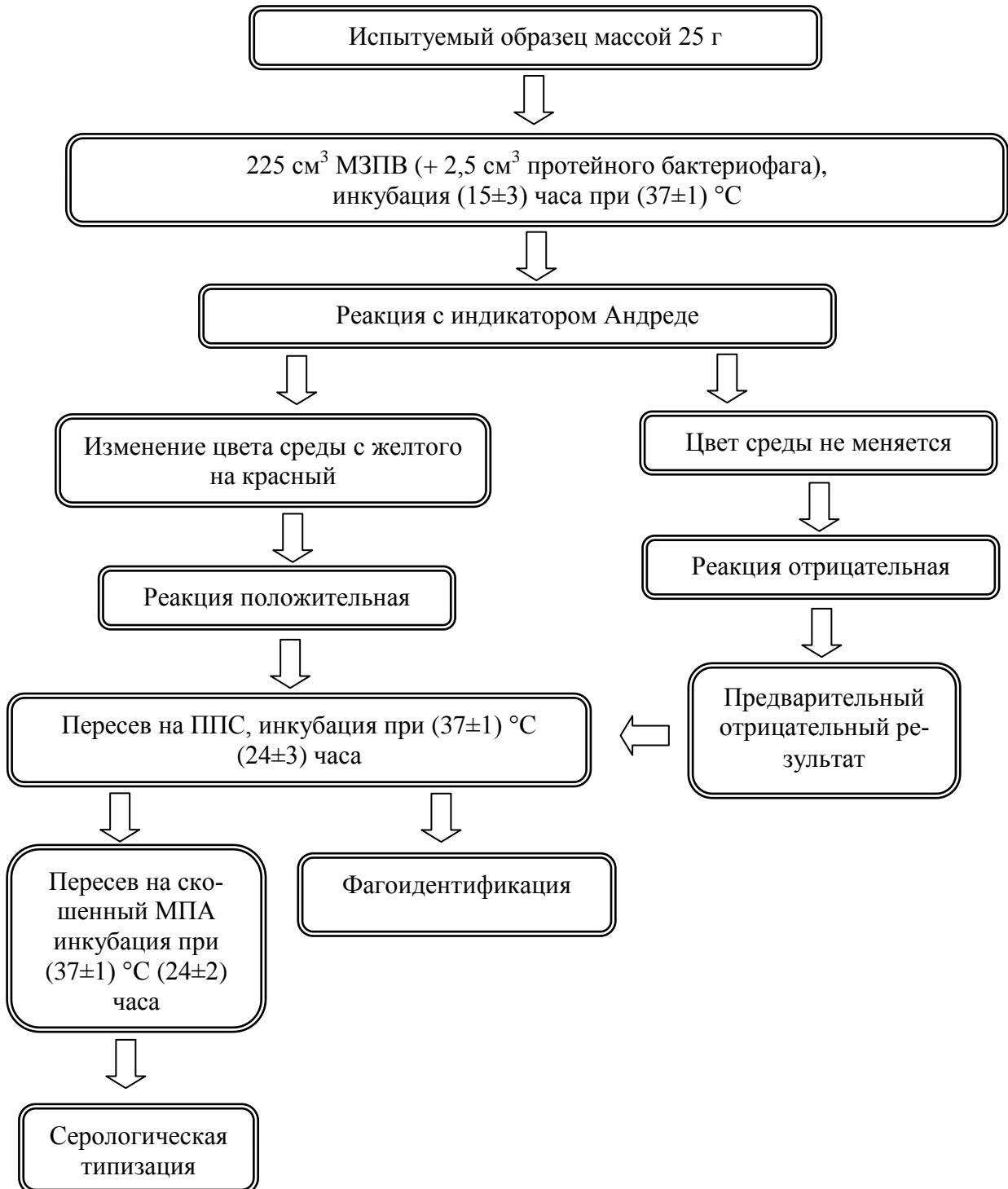


Схема постановки фагоидентификации сальмонелл

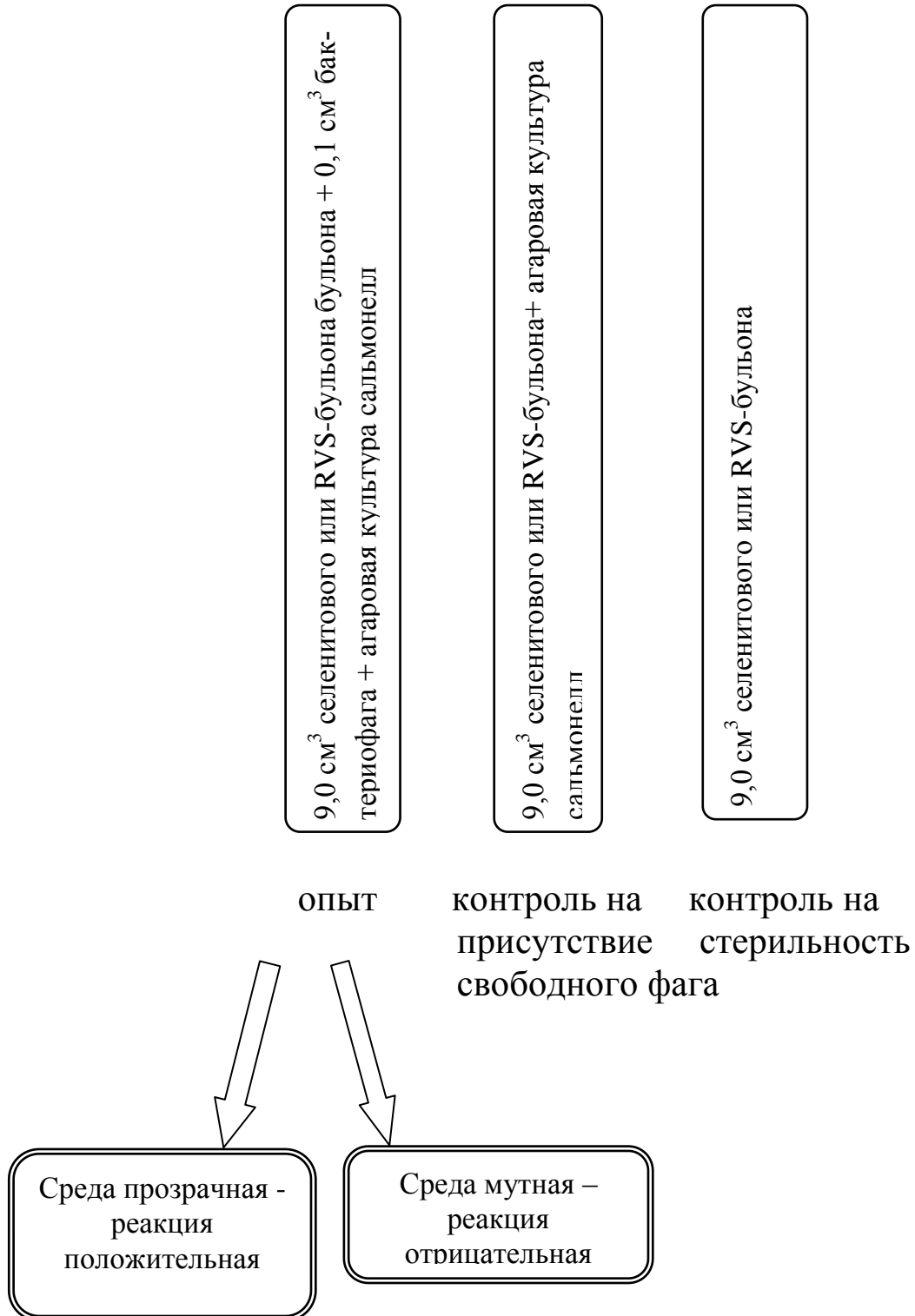
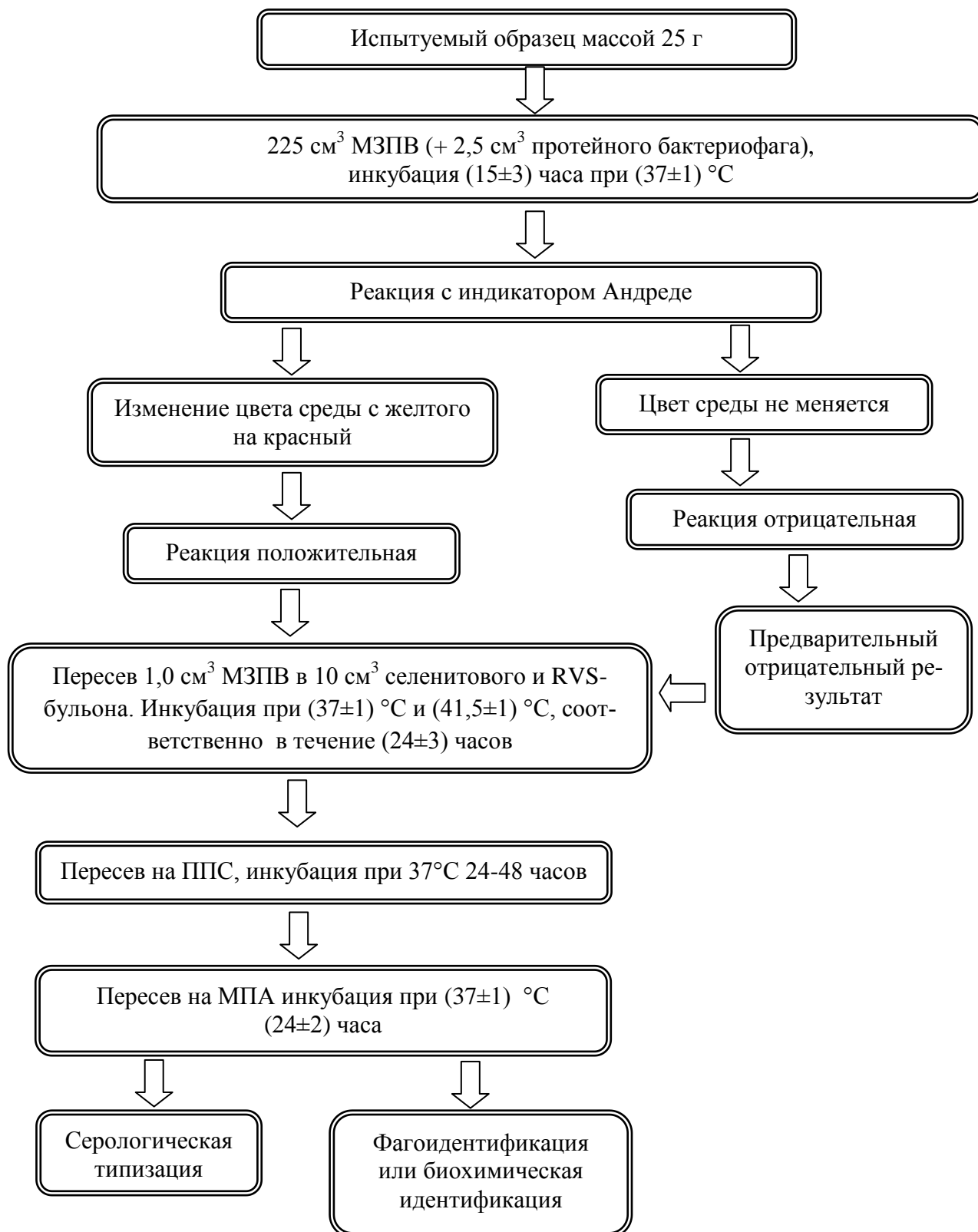




Схема определения бактерий рода *Salmonella* по ГОСТ 31659-2012 с использованием модифицированной забуференной пептонной воды



## Приложение Г

Схема определения бактерий рода *Salmonella* ускоренным способом с применением модифицированной забуференной пептонной воды и среды Раппопорта–Вассиладиса (среда MSRV), с новобиоцином

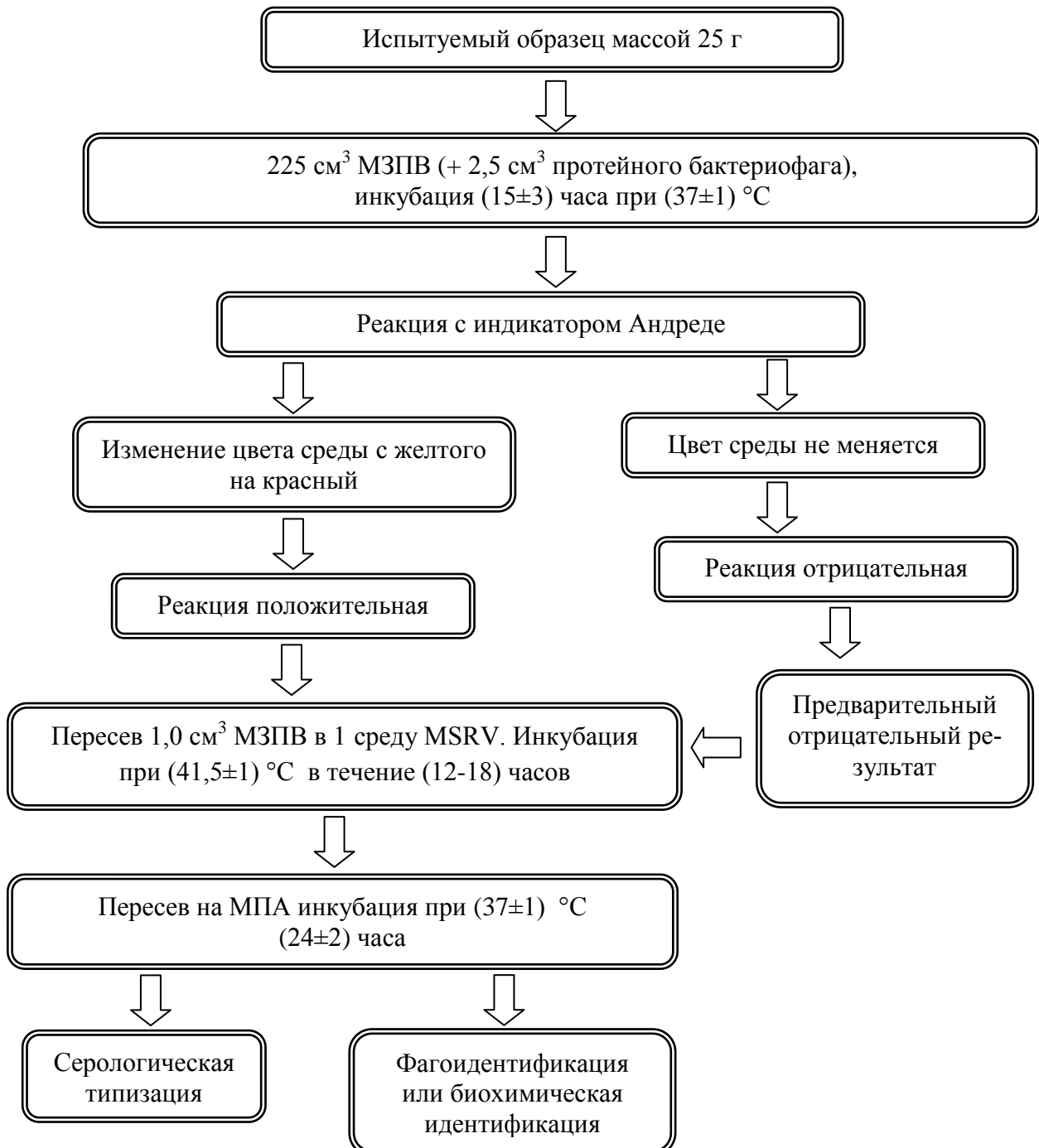


Схема определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и ИФА-экспресс-теста Singlepath®-Salmonella

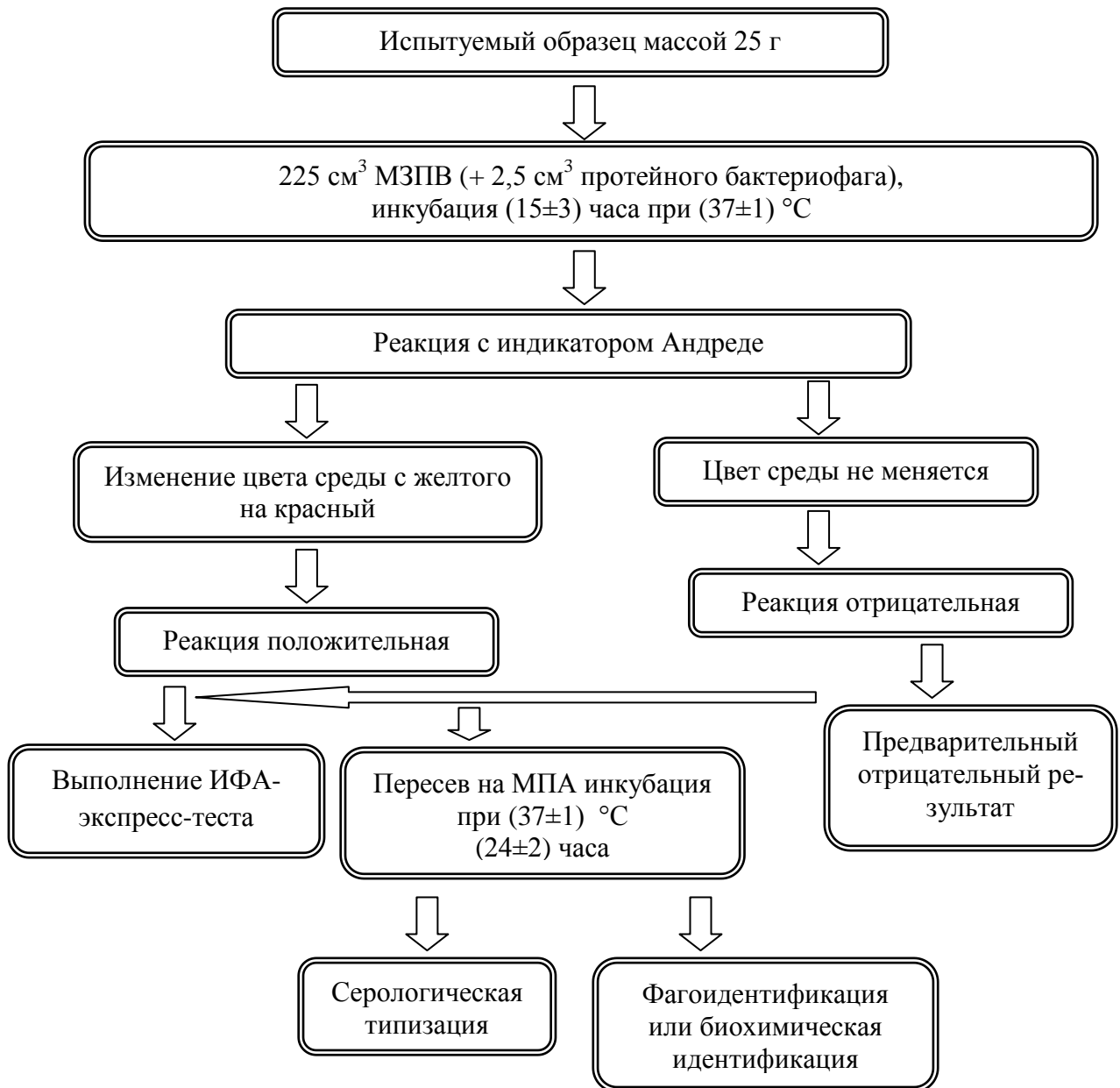
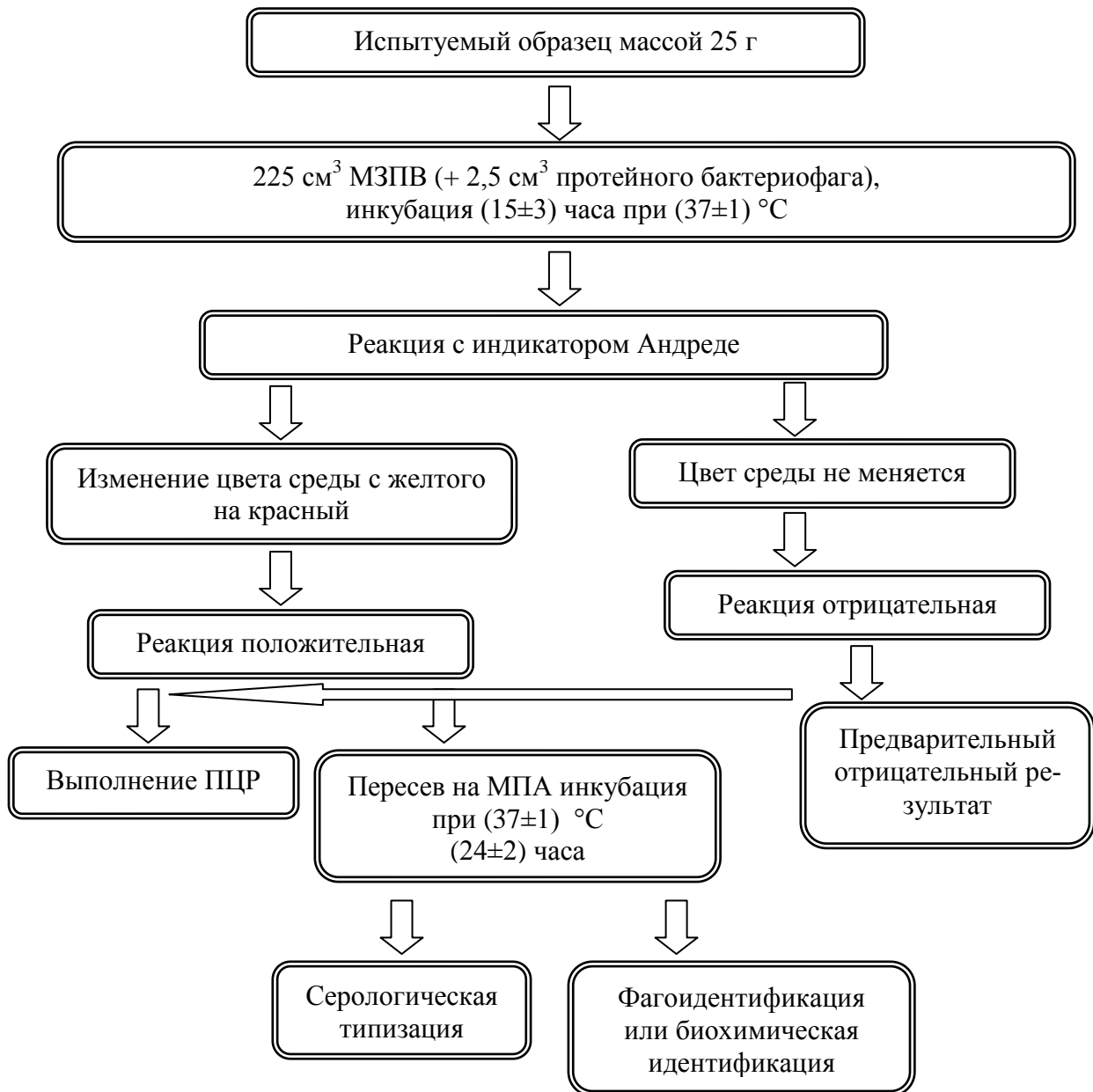


Схема определения бактерий рода *Salmonella* с применением модифицированной забуференной пептонной воды и полимеразной цепной реакции (ПЦР)



Состав и приготовление питательной среды и реактива  
для первого этапа испытаний пищевой продукции

**Ж.1. Модифицированная забуференная пептонная вода**

Ж.1.1. Состав:

пептон – 10,0 г;

натрий хлористый – 5,0 г;

натрий фосфорнокислый 12-водный двузамещенный – 9,0 г;

калий фосфорнокислый однозамещенный – 1,5 г;

пропиленгликоль – 35,2 г;

вода дистиллированная – 1000 см<sup>3</sup>

Ж.1.2. Приготовление:

При нагревании компоненты растворить в необходимом объеме воды. Установить такой рН, чтобы после стерилизации он составлял (7,0±0,2) при температуре 25 °С. Фильтровать через складчатый бумажный фильтр. Стерилизовать 15 мин в автоклаве при температуре (121±1) °С. Охладить до 90...95 °С и добавить необходимое количество пропиленгликоля.

**Ж.2. Индикатор Андрее**

Ж.2.1. Состав:

кислый фуксин – 0,5 г;

натрия гидроокись – 0,8 г;

вода дистиллированная – 120 см<sup>3</sup>

Ж.2.2. Приготовление:

Приготовить 4 % раствор гидроокиси натрия (20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворить 0,8 г гидроокиси натрия). В 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворить 0,5 г кислого фуксина и добавить 15 см<sup>3</sup> 4% раствора гидроокиси натрия. Выдержать раствор при комнатной температуре 24 часа, затем добавить 1-2 см<sup>3</sup> 4% раствора гидроокиси натрия и вновь выдержать раствор при комнатной температуре 24 часа.

Интерпретация биохимических тестов

Серотип саль- монелл	Уреаза	Аргинин	Орнитин	Л-лизин	Серовороток	Индол Симмонса	Мальтоза	β-галактозидаза	Салицин	Сорбитол	Мелибиоза	Лейлобиоза	Лактоза	Tрегалоза	Маннитол	β-глюкуронидаза	Дульцит	Адонитол	Арабитол	Сахароза	Инозитол	Раффиноза	Эскулин	β-ксилоксидаза
<i>S. Typhimurium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	*
<i>S. Dublin</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	*
<i>S. Choleraesuis</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	*
<i>S. Gallinarum- Pullorum</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+/+	-	-	+/+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. Infantis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	*
<i>S. Hamburg</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	*
<i>S. Virchow</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	*



Научное издание

**Чугунова** Елена Олеговна, **Татарникова** Наталья Александровна

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ  
В МЯСЕ И МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ**

*Методические рекомендации*

Подписано в печать 21.07.17. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Усл. печ. л. 1,88. Тираж 45 экз. Заказ № 61

*ИПЦ «Трокростъ»*

Пермской государственной сельскохозяйственной академии  
имени академика Д.Н. Прянишникова,  
614990, Россия, г. Пермь, ул. Петропавловская, 23  
тел. (342) 210-35-34