ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 52832—2007 (ИСО 8870:2006)

МОЛОКО И ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ МОЛОКА

Обнаружение термонуклеазы, образуемой коагулазоположительными стафилококками

ISO 8870:2006
Milk and milk-based products — Detection of thermonuclease produced by coagulase-positive staphylococci
(MOD)

БЗ 2—2008/540

Москва

2008

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» совместно с ГУ Ярославской области «Ярославский государственный институт качества сырья и пищевых продуктов» на основе аутентичного перевода международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г. № 459-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 8870:2006 «Молоко и продукты на основе молока. Обнаружение термонуклеазы, образуемой коагулазоположительными стафилококками» (ISO 8870:2006 «Milk and milk-based products — Detection of thermonuclease produced by coagulase-positive staphylococci»). При этом дополнительные слова, фразы, показатели и их значения, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделены в тексте стандарта курсивом

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО И ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ МОЛОКА

Обнаружение термонуклеазы, образуемой коагулазоположительными стафилококками

Milk and milk-based products — Detection of thermonuclease
produced by coagulase-positive staphylococci

Дата введения — 2009—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт *устанавливает качественный* метод *определения* термонуклеазы, образуемой коагулазоположительными стафилококками в молоке и продуктах на основе молока.

Наличие в молоке и продуктах на основе молока термонуклеазы может использоваться как индикатор достижения роста стафилококков опасного уровня и отражать вероятное присутствие стафилококкового энтеротоксина.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 51446—99 Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований (ИСО 7218—96 «Микробиология продуктов питания и кормовых продуктов. Общие правила микробиологических исследований», MOD)

ГОСТ 9225—84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **термонуклеаза** (thermonuclease): Фермент, образуемый коагулазоположительными стафилококками, гидролизирующий дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) при условиях, описанных в настоящем стандарте.

4 *Сущность метода*

Метод основан на расщеплении ДНК термонуклеазой, при котором цвет агара изменяется с синего на розовый. Цветная реакция обусловлена метахроматическими свойствами толуидинового синего О.

5 *Подготовка к испытанию*

5.1 Основные материалы

Для текущей лабораторной практики см. *ГОСТ 9225.*

Используют реактивы только аналитического качества, если не оговорено иначе, и только дистиллированную или деминерализованную воду, или воду аналогичной чистоты.

Если приготовленные среды и реактивы не используют немедленно, их хранят, если не оговорено иначе, в *защищенном от света месте* при температуре от 0 °С до 5 °С не более 1 мес в условиях, предотвращающих любые изменения в их составе.

5.2 Толуидиновый синий О-ДНК агар

5.2.1 Трис-буфер

5.2.1.1 Состав:

трис(гидроксиметил)аминометан ($C_4H_{11}NO_3$) — 6,06 г ;

хлорид кальция ($CaCl_2$) — 0, 11 г;

вода — 1000 *см*^{3} .

5.2.1.2 Приготовление

Растворяют трис(гидроксиметил)аминометан и хлорид кальция в 980 *см*^{3} воды. Доводят pH до 9,0 и воду до 1000 *см*^{3}.

5.2.2 Основа среды

5.2.2.1 Состав:

дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — 0,3 г;

хлорид натрия (NaCl) — 10,0 г ;

агар — 10,0 г;

трис-буфер (см. 5.2.1) — 1000 *см*^{3}.

5.2.2.2 Приготовление

Компоненты нагревают на водяной бане (см. 6.2) до полного растворения ДНК и агара (около 1,5 ч).

5.2.3 Раствор толуидинового синего О

5.2.3.1 Состав:

толуидиновый синий О ($C_{15}H_{16}N_3SCl$) — 0,31 г;

вода — *10 см*^{3}.

5.2.3.2 Приготовление

Толуидиновый синий О растворяют в воде при слабом нагревании и фильтруют через марлю (см. 6.12).

5.2.4 Полная среда

5.2.4.1 Состав:

основа среды (см. 5.2.2) — 1000 *см*^{3};

раствор толуидинового синего О (см. 5.2.3) — 3 *см*^{3}.

5.2.4.2 Приготовление

Основу среды охлаждают до (*50* ± *1*) °С, добавляют профильтрованный раствор толуидинового синего О и перемешивают.

Полная среда может храниться маленькими порциями в закупоренных колбах или бутылях несколько месяцев в *защищенном от света месте* при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.2.5 Приготовление чашек со средой

В чашки Петри (см. 6.8) вносят по 13 *см*^{3} свежей полной среды (см. 5.2.4) или хранившейся среды, предварительно расплавленной при (*50* ± *1*) °С. Дают агару застыть.

Приготовленные среды могут храниться *не более* 2 мес (дном кверху и защищенными от высыхания) в *защищенном от света месте* при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.3 Соляная кислота, *c* (HCl) = 2 моль/*дм*^{3}

5.4 Гидроокись натрия, *c* (NaOH) = 2 моль/*дм*^{3}

5.5 Трихлоруксусная кислота, *c* (CCl_3COOH) = 3 моль/*дм*^{3}.

Растворяют 49,02 г трихлоруксусной кислоты в 100 *см*^{3} воды.

5.6 Обезжиренное сухое молоко

Обезжиренное сухое молоко должно быть свободно от термонуклеазы. Наличие термонуклеазы проверяют в каждой новой партии, используя метод, приведенный в настоящем стандарте.

5.7 Бульон на основе *сердечно-мозгового* перевара (бульон BHI)

5.7.1 Состав:

ферментативный перевар животных тканей — 10,0 г;

обезвоженный перевар телячьего мозга —12,5 г;

обезвоженный перевар бычьего сердца — 5,0 г;

глюкоза — 2,0 г;

хлорид натрия — 5,0 г;

моногидрофосфат натрия, безводный (Na_2HPO_4) — 2,5 г;

вода — 1000 *см*^{3}.

5.7.2 Приготовление

Растворяют компоненты среды или готовую дегидратированную питательную среду в воде, при необходимости подогревают. Устанавливают такой уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал 7,4 ± 0,2 при температуре 25 °С.

Среду разливают по 5 *см*^{3} в пробирки (см. 6.11).

Среду стерилизуют при (*121* ± *1*) °С в течение 15 мин.

5.8 Тест-микроб (положительный контроль)

В качестве положительного контроля используют любой штамм *Staphylococcus aureus*, образующий термонуклеазу.

6 Оборудование *и лабораторная посуда*

Используют оборудование, необходимое для подготовки проб согласно ГОСТ Р 51446, обычное лабораторное оборудование, а также следующее:

6.1 Термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С.

6.2 Водяная баня, поддерживающая температуру (*50* ± *1*) °С, а также температуру кипячения (для разогрева и охлаждения питательных сред и реактивов до необходимой температуры).

6.3 Центрифуга с частотой вращения более 27000 мин$^{-1}$.

6.4 Центрифуга с частотой вращения более 2800 мин$^{-1}$.

6.5 Металлический цилиндрический пробойник диаметром около 2 мм, для прорезания лунок в *толуидиновом синем О-ДНК агаре*.

6.6 Микропипетки вместимостью 0,01 *см*^{3}.

6.7 Бактериологические петли из *проволоки* платино-иридиевого или никельхромового сплава *диаметром* около 3 мм.

6.8 Чашки Петри, стеклянные или пластиковые, диаметром 90 и 100 мм.

6.9 Мерные цилиндры вместимостью 10, 100 и 1000 *см*^{3}.

6.10 Бутыли с пробками, для хранения *толуидинового синего О-ДНК агара.*

6.11 Пробирки диаметром 15 мм и длиной 100 мм.

6.12 Марля .

При одинаковой спецификации одноразовое оборудование предпочтительнее многоразового.

Стеклянная лабораторная посуда должна выдерживать повторные циклы стерилизации и быть химически инертной.

7 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, приведенного в настоящем стандарте. Рекомендуемым методом отбора проб является метод, приведенный в *ГОСТ 26809.*

Образцы хранят в условиях, предотвращающих их порчу и любые изменения в составе.

8 *Проведение испытания*

Величину pH молока, восстановленного сухого молока или гомогенизированных продуктов на основе молока после добавки обезжиренного сухого молока доводят до 3,8 и центрифугируют. Супернатант осаждают трихлоруксусной кислотой. Центрифугируют, pH осадка доводят до pH 8,5 и добавляют трис-буфер. Раствор прогревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и определяют наличие термонуклеазной активности на *толуидиновом синем О-ДНК агаре.*

8.1 Подготовка образцов

8.1.1 Молоко

pH пробы молока объемом 100 *см*^{3} доводят соляной кислотой (см. 5.3) до 3,8.

8.1.2 Продукты на основе молока

Суспензируют 20 г образца и 5 г обезжиренного сухого молока (см. 5.6) в 50 *см*^{3} воды. pH пробы доводят соляной кислотой (см. 5.3) до 3,8.

Добавление обезжиренного сухого молока не является обязательным для всех продуктов на основе молока. При исследовании, например, сухого обезжиренного молока, цельного сухого молока или казеинов его можно не добавлять. Добавление обязательно в случае сухой сыворотки, йогурта, фруктового йогурта и фруктового мороженого. Для остальных продуктов на основе молока добавление обезжиренного сухого молока также рекомендуется.

Для *испытания* сыра можно использовать альтернативную процедуру. Суспензируют с помощью блендера 20 г сыра в 100 *см*^{3} теплой (45 °С) воды. После смешивания pH пробы доводят соляной кислотой (6 моль/л) до 4,5. Суспензию переносят в плоскодонную колбу объемом 750 *см*^{3}. Добавляют воды до конечного объема в 12,5 раз большего массы сыра. Суспензию встряхивают в течение ночи (16 ч) на водяной бане при температуре (*25* ± *1*) °С. Снова доводят pH до 4,5. Суспензию центрифугируют и фильтруют. Отбирают 100 см^3 фильтрата и проводят испытание согласно 8.1.3.

Если сухое обезжиренное молоко не добавляется, суспензируют 20 г в 40 *см*^{3} воды. pH пробы доводят соляной кислотой (см. 5.3) до 3,8.

8.1.3 Общий ход испытания

8.1.3.1 Центрифугируют (см. 6.3) пробу с частотой вращения от 27000 мин$^{-1}$ до 34000 мин$^{-1}$ при 5 °С в течение 20 мин.

8.1.3.2 Супернатант декантируют. Добавляют 0,05 см^3 холодной трихлорацетоуксусной кислоты (см. 5.5) на 1 см^3 пробы и смешивают.

8.1.3.3 Центрифугируют с частотой вращения от 27000 мин$^{-1}$ до 34000 мин$^{-1}$ при 5 °С в течение 20 мин.

8.1.3.4 Осадок растворяют в 1 *см*^{3} трис-буфера (см. 5.2.1). pH доводят до 8,5 с помощью гидроокиси натрия (см. 5.4). Раствор разводят трис-буфером до 2 *см*^{3}, перемешивают.

8.1.3.5 Раствор прогревают в кипящей водной бане (см. 6.2) в течение 15 мин.

8.2 Приготовление тест-культуры (положительный контроль)

8.2.1 Тест-культуру (см. 5.8) засевают в бульон BHI (см. 5.7). Инкубируют 24 ч при (*37* ± *1*) °С. Центрифугируют (см. 6.4) с частотой вращения от 2800 мин$^{-1}$ до 3500 мин$^{-1}$ в течение 15 мин. Надосадочную жидкость декантируют.

8.2.2 Супернатант прогревают на кипящей водяной бане (см. 6.2) в течение 15 мин. Прогретый супернатант может храниться при температуре 5 °С *не более* четырех недель.

При необходимости любой штамм *Staphylococcus aureus* (например, выделенный из молока или продуктов на основе молока) может быть исследован на наличие термонуклеазы методом, приведенным выше для тест-культуры.

8.3 Приготовление толуидинового синего О-ДНК агара

Цилиндрическим пробойником (см. 6.5) в агаре (см. 5.2.5) прорезают *две* лунки. Агар поверхностью вниз подсушивают в термостате (см. 6.1) со снятой крышкой и в течение 60 мин при температуре (37 ± 1) °С.

При испытании нескольких образцов в одном агаре прорезают до 10 лунок.

8.4 *Определение* термонуклеазы

8.4.1 В одну из лунок вносят 10 *мм*^{3} положительного контроля (см. 8.2.2), в остальные — по 10 *мм*^{3} проб (см. 8.1.3.5).

8.4.2 Чашки Петри с крышками сверху инкубируют (см. 6.1) 4 ч при температуре (*37* ± *1*) °С. При отрицательном результате чашки инкубируют до 24 ч.

9 *Обработка результатов*

Розовое гало *(ореол или зона свечения)* диаметром более 1 мм вокруг лунки свидетельствует о наличии термонуклеазы (необходимо сравнить с положительным контролем). Гало любого иного цвета, кроме розового, не считается признаком термонуклеазной активности.

Положительный тест на термонуклеазу указывает на рост коагулазоположительных стафилококков в количестве до 10^6 КОЕ/г и более, *что приводит к образованию энтеротоксина.*

Такое количество коагулазоположительных стафилококков может выработать энтеротоксин в концентрации, достаточной для развития заболевания. Молоко и продукты на основе молока, в которых при использовании настоящего метода испытаний выявлена термонуклеаза, образуемая коагулазоположительными стафилококками, в обязательном порядке подлежат проверке на наличие энтеротоксина.

10 Протокол испытания

В протоколе испытания указывают:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- метод отбора проб;
- использованный метод испытания со ссылкой на *настоящий стандарт*;
- все детали исследования, не оговариваемые в *настоящем стандарте*, или рассматриваемые как необязательные, а также детали иного свойства, могущие оказать влияние на результаты исследований;
- полученные результаты и повторяемость (если определялась), окончательный уточненный результат испытания.

УДК 637.544:006.354 ОКС 67.100.01 Н09

Ключевые слова: молоко, продукты на основе молока, обнаружение термонуклеазы, коагулазоположительные стафилококки