ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 55027— 2012/ISO/TS 10272-3:2010

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий Campylobacter spp.

Часть 3

Полуколичественный метод

ISO/TS 10272-3:2010
Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 3: Semi-quantitative method (IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

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» (ОАО «ВНИИС») на основе аутентичного перевода на русский язык международного документа, 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 24 октября 2012 г. № 555-ст

4 Настоящий стандарт является идентичным международному документу ИСО/ТУ 10272-3:2010 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий Campylobacter spp. Часть 3. Полуколичественный метод» (ISO/TS 10272-3:2010 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 3: Semi-quantitative method») с учетом технической поправки ISO/TS 10272-3:2010/Cor.1:2011.

Техническая поправка выделена в тексте (таблица 3) вертикальной чертой.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов и документов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартинформ, 2013

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 2
4 Принцип . . . 2
5 Питательные среды и реактивы . . . 2
6 Аппаратура . . . 3
7 Отбор проб . . . 4
8 Приготовление испытуемой пробы . . . 4
9 Методика . . . 4
10 Расчет и выражение результатов . . . 7
11 Протокол испытания . . . 8
Приложение А (обязательное) Диаграмма методики . . . 9
Приложение В (обязательное) Состав и приготовление питательных сред и реактивов . . . 10
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов и документов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам) . . . 15
Библиография . . . 16

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий Campylobacter spp.

Часть 3

Полуколичественный метод

Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 3. Semi-quantitative method

Дата введения — 2014—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод полуколичественного определения *Campylobacter* spp.

Настоящий стандарт распространяется:

- на пищевую продукцию и корма для животных;
- на пробы окружающей среды в области производства и обращения пищевой продукции.

Настоящий стандарт не применяют при контроле некоторых видов пищевой продукции и кормов.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного стандарта. Для датированных ссылок применяется только указанное издание. Для недатированных ссылок применяется последнее издание стандарта (включая любые изменения).

ИСО 6887 (все части) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований (ISO 6887 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination (all part))

ИСО 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям (ISO 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations)

ИСО/ТУ 11133-1 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории (ISO/TS 11133-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory)

ИСО/ТУ 11133-2:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по определению эффективности питательных сред (ISO/TS 11133-2:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media)

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

3.1 **Campylobacter (Campylobacter)** (Микробиология Campylobacter лищевых продуктов и кормов для животных): Род микроорганизмов, образующих характерные колонии на твердых селективных средах, когда их инкубируют микроаэробным способом при температуре 41,5 °С, но не при 25 °С, и которые обладают характерной подвижностью, биохимическими свойствами и способностью к росту, описанными в тех случаях, когда испытания проводятся в соответствии с настоящим стандартом.

Примечание — Наиболее часто встречающимися видами являются *Campylobacter jejuni* и *C. coli*. Вместе с тем были описаны и другие виды (*C. lari*, *C. upsaliensis* и некоторые другие).

3.2 **полуколичественное определение (semi-quantitative determination)** (Микробиология Campylobacter пищевых продуктов и кормов для животных): Определение уровня загрязнения *Campylobacter* в том случае, когда ожидается небольшое количество, или если уровень сопутствующей флоры относительно высок.

4 Принцип

4.1 Общие положения

Для полуколичественного определения *Campylobacter* spp. необходимо выполнение операций, описанных в 4.2—4.4 (см. рисунок А.1).

4.2 Обогащение в селективной жидкой среде

Пробу для анализа и ее десятичные разбавления инокулируют или разбавляют в жидкой обогатительной среде (бульон Болтона) и гомогенизируют.

Обогатительную среду инкубируют при 37 °С в течение 4—6 ч и затем при 41,5 °С в течение (44 ± 4) ч.

4.3 Изоляция и отбор для подтверждения

Из культур, полученных по 4.2, твердую селективную среду, основанную на модифицированном агаре с углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (mCCD агар), инокулируют, инкубируют при 41,5 °С в микроаэробной атмосфере и проверяют после (44 ± 4) ч с целью обнаружения присутствия колоний, которые по своим характеристикам предположительно являются *Campylobacter* spp.

4.4 Подтверждение

Колонии, предположительно являющиеся *Campylobacter* spp., пересевают на неселективный колумбийский кровяной агар и затем подтверждают при помощи исследования под микроскопом и надлежащих биохимических испытаний, и испытаний на рост. Дополнительно вид *Campylobacter* spp. идентифицируют путем специфических биохимических испытаний и испытаний на чувствительность к антибиотикам.

5 Питательные среды и реактивы

5.1 Общие положения

Для получения информации об общепринятой лабораторной практике см. ИСО 7218, ИСО/ТУ 11133-1 и ИСО/ТУ 11133-2.

Примечание — Ввиду наличия большого количества питательных сред и реактивов и для ясности изложения, их составы и процедуры приготовления приведены в приложении В.

5.2 Жидкая обогатительная среда: бульон Болтона

См. В.1.

5.3 Селективная среда для чашек Петри: модифицированный агар с углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (mCCD агар)

См. В.2.

5.4 Среды и реактивы для подтверждения и идентификации

5.4.1 Колумбийский кровяной агар

См. В.3.

5.4.2 Бульон для бруцелл

См. В.4.

5.4.3 Реактив для обнаружения оксидазы

См. В.5.

5.4.4 Раствор пероксида водорода, 3 % (объемная доля)

5.4.5 Реактивы для определения гидролиза гиппурата

См. В.6.

5.4.6 Кровяной агар Мюллера-Хинтона

См. В.7.

5.4.7 Диски с налидиксовой кислотой и цефалотином

Каждый тип диска содержит по 30 мкг реактива.

5.4.8 Диски с индоксилацетатом

См. В.8.

6 Аппаратура

Используют обычную микробиологическую лабораторную аппаратуру (см. ИСО 7218) и, в частности, нижеприведенную.

6.1 Оборудование для сухой стерилизации (сушильный шкаф) или влажной стерилизации (автоклав).

См. ИСО 7218.

6.2 Сушильный шкаф, ламинарный бокс или термостат, способные функционировать в диапазоне температур от 37 °С до 55 °С.

6.3 Термостат, работающий при температуре (25 ± 1) °С, (37 ± 1) °С и (41,5 ± 1) °С.

6.4 Баня водяная, работающая при температуре (37 ± 1) °С.

6.5 Баня водяная, работающая в диапазоне температур от 47 °С до 50 °С.

6.6 pH-метр, с точностью до 0,1 ед. pH при температуре 25 °С.

6.7 Емкости, в частности, культуральные пробирки с размерами 18 мм × 180 мм и 9 мм × 180 мм, пробирки для гемолиза с размерами 13 мм × 75 мм, бутылки с нетоксичными металлическими крышками и/или колбы подходящей вместимости с соответствующими крышками.

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

6.9 Пипетки градуированные, поставляющие полный объем, с широким отверстием, номинальной вместимостью 1 см^3 и 10 см^3, градуированные с ценой деления 0,1 см^3, ИСО 835 класс А [1], и пастеровские пипетки, ИСО 7712 [2].

6.10 Соски резиновые, или любая другая безопасная система, которую можно адаптировать к градуированным пипеткам.

6.11 Петли стерильные, из платиново-иридиевого или никелево-хромового сплава либо пластиковые, с диаметром приблизительно 3 мм, и проволоки из того же материала или стеклянная, или пластиковая палочка.

Петля из никелево-хромового сплава не пригодна для использования в испытании на оксидазу (см. 9.5.6).

6.12 Пинцет, тонкий, с закругленными краями, из нержавеющей стали.

6.13 Микроскоп предпочтительно с фазовым контрастом (для наблюдения характерной подвижности *Campylobacter* spp.).

6.14 Оборудование, пригодное для достижения микроаэробной атмосферы с объемными долями: кислорода (5 ± 2) %, диоксида углерода (10 ± 3) %, альтернативного водорода ≤ 10 %, с соблюдением баланса азота. Используют надлежащие герметичные контейнеры, чтобы удерживать чашки Петри и/или колбы, или бутылки вместимостью примерно 350 см^3, используемые для обогатительного бульона, например, бактериологические анаэробные сосуды.

Примечание 1 — Соответствующая микроаэробная атмосфера может быть получена при использовании имеющихся в продаже газогенераторных комплектов; следует в точности соблюдать инструкции изготовителя,

особенно те из них, которые касаются объема сосуда и вместимости газогенераторного комплекта. В качестве альтернативы можно использовать заполнение сосуда надлежащей газовой смесью перед инкубацией.

Примечание 2 — В качестве альтернативы инкубации в микроаэробной атмосфере, обогатительный бульон можно инкубировать в бутылках с винтовыми крышками, колбах или пробирках, заполнив их обогатительным бульоном, оставляя свободное пространство величиной менее 20 мм и тщательно закупоривая крышками.

7 Отбор проб

В лабораторию должна поступать репрезентативная проба. Она не должна подвергаться повреждению или изменению в период транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуется конкретный стандарт, распространяющийся на данную продукцию. Если не существует конкретного стандарта, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по данному вопросу.

Принимая во внимание, что *Campylobacter* spp. весьма чувствительны к замораживанию, но наиболее устойчивы при низких температурах, рекомендуется, чтобы пробы хранились при температуре (3 ± 2) °С и анализировались в кратчайшие сроки. Также принимают меры по предотвращению высыхания проб.

8 Приготовление испытуемой пробы

Испытуемую пробу приготовляют в соответствии с соответствующей частью ISO 6887, распространяющейся на определенный вид продукции. Если не существует соответствующей части ISO 6887, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по данному вопросу.

9 Методика

9.1 Общие положения

См. рисунок А.1.

9.2 Проба для анализа, исходная суспензия и разбавления

9.2.1 Вводят пробу для анализа в количестве *x* г или *x* см^3 (минимум 15 г или 15 см^3) из испытуемой пробы (раздел 8) в восьмикратный объем (120 см^3 минимум) обогатительной среды — бульон Болтона (5.2) и гомогенизируют.

Полученная суспензия является исходной суспензией.

9.2.2 Переносят 90 см^3 исходной суспензии (9.2.1) в бутылку вместимостью 100 см^3. Это соответствует 10 г пробы для анализа. При подсчете результатов это разбавление соответствует 10^1.

9.2.3 Переносят 10 см^3 исходной суспензии (9.2.1) в культуральную пробирку. При подсчете результатов это разбавление соответствует 10^0. После следующей стадии разбавления (9.2.4) остается 9 см^3 этого разбавления. Это соответствует 1 г пробы для анализа.

9.2.4 Делают обычную серию 10-кратных разбавлений (например, до 10^{-4}) из 10^0 разбавления (9.2.3), перенося по 1,0 см^3 в пробирки, содержащие 9,0 см^3 бульона Болтона. Из наибольшего разбавления отбрасывается 1,0 см^3, поскольку все пробирки должны содержать по 9,0 см^3. При подсчете результатов эти разбавления соответствуют 10^{-1}, 10^{-2} и т. д.

9.3 Обогащение

Инкубируют пробы для анализа и разбавления (9.2.2, 9.2.3 и 9.2.4) в микроаэробной атмосфере (6.14) при 37 °С от 4 ч до 6 ч, затем при 41,5 °С в течение (44 ± 4) ч.

9.4 Изоляция

9.4.1 Используя каждую из культур, полученных в обогатительной среде (9.3), инокулируют стерильной петлей (6.11) поверхность слоев с селективной изолирующей средой на основе mCCD агара (5.3).

9.4.2 Инкубируют слои (9.4.1) при 41,5 °С в микроаэробной атмосфере (6.14).

9.4.3 После инкубации в течение (44 ± 4) ч исследуют слои с целью выявления типичных и/или подозрительных колоний *Campylobacter* spp.

Типичные колонии на mCCD агаре имеют сероватый цвет, часто с металлическим блеском, они плоские и влажные и имеют тенденцию к разрастанию. Разрастание колоний выражено меньше на более сухих поверхностях агара. Могут встречаться и другие формы колоний.

9.5 Подтверждение вида *Campylobacter* spp.

9.5.1 Общие положения

Поскольку рассматриваемые бактерии быстро разрушаются на воздухе, необходимо незамедлительно следовать процедурам, описанным в 9.5.2—9.5.6.

9.5.2 Отбор колонии для подтверждения

9.5.2.1 Для подтверждения с каждого слоя (9.4.3) отбирают по меньшей мере одну колонию, рассматриваемую в качестве типичной или подозрительной колонии *Campylobacter* spp., исследуют морфологию и подвижность с помощью микроскопа (9.5.3.1) и продолжают тем же способом с еще четырьмя колониями, если первая дала отрицательный результат.

9.5.2.2 Производят посев каждой из отобранных колоний на слой колумбийского кровяного агара (5.4.1), чтобы дать развиться четко изолированным колониям. Слои инкубируют в микроаэробной атмосфере при 41,5 °С в течение 24 ч — 48 ч. При исследовании морфологии, подвижности, микроаэробного роста при 25 °С, аэробного роста при 41,5 °С и присутствия оксидазы используют чистые культуры.

9.5.3 Исследование морфологии и подвижности

9.5.3.1 Суспендируют одну колонию со слоя колумбийского кровяного агара (9.5.2.2) в 1 $см^3$ бульона для бруцелл (5.4.2) или солевого раствора пептона и исследуют морфологию и подвижность при помощи микроскопа (6.13).

9.5.3.2 Для дальнейшего исследования сохраняют все культуры (9.5.2.2), в которых обнаружены изогнутые бациллы со спиральной «штопорообразной» подвижностью (9.5.3.1).

9.5.4 Исследование роста при температуре 25 °С (микроаэробного)

Используя колонии, изолированные в 9.5.2.2, инокулируют при помощи петли (6.11) поверхность слоя колумбийского кровяного агара (5.4.1)).

Инкубируют слой при 25 °С в микроаэробной атмосфере (6.14) в течение (44 ± 4) ч.

Исследуют слой с целью выявления видимого роста колоний *Campylobacter* spp.

9.5.5 Исследование роста при температуре 41,5 °С (аэробного)

Используя колонии, изолированные в 9.5.2.2, инокулируют при помощи петли (6.11) поверхность слоя колумбийского кровяного агара (5.4.1).

Инкубируют слой при температуре 41,5 °С в аэробной атмосфере в течение (44 ± 4) ч.

Исследуют слой с целью выявления видимого роста колоний *Campylobacter* spp.

9.5.6 Обнаружение оксидазы

Используя петлю из платиново-иридиевого сплава, пластиковую петлю или стеклянную палочку (6.11), отбирают порцию четко изолированной колонии из каждой отдельной чашки (9.5.2.2) и наносят на фильтровальную бумагу, смоченную реактивом для обнаружения оксидазы (5.4.3). Появление розовато-лилового, фиолетового или темно-синего цвета в течение 10 с свидетельствует о положительной реакции. Если используется имеющийся в продаже набор для анализа оксидазы, необходимо следовать инструкциям изготовителя.

Подтверждают результаты, используя положительный и отрицательный контроль. Примерами подходящих контрольных штаммов являются *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 (положительный контроль) и *Escherichia coli* NCTC 9001 (отрицательный контроль).

9.5.7 Интерпретация

Campylobacter spp. дает результаты согласно таблице 1.

Таблица 1 — Характеристики *Campylobacter* spp.

Морфология (9.5.3)	Малые искривленные бациллы
Подвижность (9.5.3)	Характерная
Микроаэробный рост при температуре 25 °С (9.5.4)	–
Аэробный рост при температуре 41,5 °С (9.5.5)	–
Оксидаза (9.5.6)	+

Campylobacter spp. присутствует, если по меньшей мере одна колония демонстрирует вышеуказанные характеристики.

9.6 Идентификация вида *Campylobacter* spp. (альтернативная процедура)

9.6.1 Общие положения

Из видов *Campylobacter* spp., произрастающих при температуре 41,5 °С, чаще всего встречаются *C. jejuni* и *C. coli*. Вместе с тем были описаны другие виды (*C. lari*, *C. upsaliensis* и некоторые другие); характеристики, приведенные в таблице 2, позволяют провести их дифференциацию.

Таблица 2 — Характеристики видов *Campylobacter* spp.

Характеристика	*C. jejuni*	*C. coli*	*C. lari*	*C. upsaliensis*
Каталаза (9.6.2)	+	+	+	отрицательная или в слабой форме
Налидиксовая кислота (9.6.3)	S[a)]	S[a)]	R/S[b)]	S
Цефалотин (9.6.3)	R	R	R	S
Гидролиз гиппурата (9.6.4)	+[c)]	–	–	–
Индоксилацетат (9.6.5)	+	+	–	+
Обозначения: + = положительная; – = отрицательная; S = чувствительный; R = устойчивый.				
[a)] Было обнаружено увеличение устойчивости к налидиксовой кислоте штаммов *C. jejuni* и *C. coli*. [b)] Существуют одновременно чувствительные и устойчивые штаммы *C. lari*. [c)] Существуют гиппурат-отрицательные штаммы *C. jejuni*.				

9.6.2 Обнаружение каталазы

Для каждой колонии, отобранной в соответствии с 9.5.2.2, наносят петлю культуры в каплю раствора пероксида водорода (5.4.4) на чистом предметном стекле.

Испытание считается положительным, если в течение 30 с появляются пузырьки.

Подтверждают результаты, используя положительный и отрицательный контроль. Примерами подходящих контрольных штаммов являются *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 (положительный контроль) и *Enterococcus faecalis* NCTC 775 (отрицательный контроль).

9.6.3 Определение чувствительности к налидиксовой кислоте и цефалотину

Для каждой колонии, отобранной в соответствии с 9.5.2.2, используют петлю (6.11) с целью приготовления суспензии в бульоне для бруцелл (5.4.2) плотностью 0,5 по шкале Мак Фарланда.

Разбавляют суспензию в соотношении 1:10 тем же бульоном.

Заливают суспензией поверхность слоя с 5 % (объемная доля) кровяного агара Мюллера-Хинтона (5.4.6).

Выдерживают в течение 5 мин, затем сливают избыток суспензии.

Высушивают чашки в сушильном шкафу (6.2) при температуре 37 °С в течение 10 мин.

Помещают на поверхность агара диск с налидиксовой кислотой (5.4.7) и диск с цефалотином (5.4.7).

Инкубируют чашки крышками вверх при температуре 37 °С в течение (22 ± 2) ч в микроаэробной атмосфере (6.14).

Интерпретируют результаты бактериального роста следующим образом:

- рост, который наблюдается при контакте с диском, классифицируется как устойчивый;
- при наличии зоны любых размеров, обусловленной ингибированием роста, он классифицируется как чувствительный.

9.6.4 Определение гидролиза гиппурата

Для каждой колонии, отобранной в соответствии с 9.5.2.2, используют петлю (6.11) с большим количеством инокулята с целью приготовления суспензии в пробирке для гемолиза (6.7), содержащей 0,4 см^3 раствора гиппурата натрия (5.4.5), при этом обращают особое внимание, чтобы исключить попадание агара.

Встряхивают с целью тщательного перемешивания и инкубируют в течение 2 ч на водяной бане (6.4) при температуре 37 °С или в течение 4 ч в термостате при 37 °С.

Осторожно добавляют 0,2 см^3 раствора нингидрина (5.4.5) на поверхность раствора гиппурата натрия. Избегают встряхивания.

Интерпретацию производят после дополнительного инкубирования в течение 10 мин на водяной бане (6.4) при 37 °С или в термостате при 37 °С.

Темно-фиолетовый цвет свидетельствует о положительной реакции.

Светло-фиолетовый цвет или отсутствие окраски свидетельствуют об отрицательной реакции.

Подтверждают результаты, используя положительный и отрицательный контроль. Примерами подходящих контрольных штаммов являются *C. jejuni* NCTC 11351 (положительный контроль), *C. coli* NCTC 11366 (отрицательный контроль).

9.6.5 Определение гидролиза индоксилацетата

Помещают колонию, отобранную в соответствии с 9.5.2.2, на диск с индоксилацетатом (5.4.8) и добавляют каплю стерилизованной дистиллированной воды. Для проведения отчетливой реакции требуется полная петля материала колоний.

В случае гидролиза индоксилацетата в течение 5—10 мин наблюдается изменение цвета в сторону темно-синего. Отсутствие изменения цвета свидетельствует о том, что гидролиза не было.

Подтверждают результаты, используя положительный и отрицательный контроль. Примерами подходящих контрольных штаммов являются *C. jejuni* NCTC 11351 (положительный контроль), *C. lari* NCTC 11352 (отрицательный контроль).

9.6.6 Интерпретация

Виды *Campylobacter* spp., показывающие рост при 41,5 °С, могут быть идентифицированы в соответствии с таблицей 2.

10 Расчет и выражение результатов

10.1 Метод расчета

Полуколичественный метод основан на количественном обнаружении в отобранных разведениях. Поэтому результат приводится в диапазонах, соответствующих таблице 3.

Пуассоновское распределение используется для оценки диапазона концентраций, которые согласуются с серией результатов. Например, если истинная концентрация 0,005 КОЕ/г, то вероятность положительного результата для 10^1 разведения составляет 5 %. Если истинная концентрация 3 КОЕ/г, то вероятность положительного результата для 10^0 разведения составляет 95 %. Однако если для 10^1 разведения наблюдается положительный результат, а для 10^0 разведения и более высоких разведений — отрицательный результат, то истинная концентрация, вероятно, находится в диапазоне между 0,005 КОЕ/г и 3 КОЕ/г.

Таблица 3 — Диапазоны результатов для серии разбавлений

Количество, г	Рост подтвержденных *Campylobacter* spp.						
10^1	–	+	+	+	+	+	+
10^0	–	–	+	+	+	+	+
10^{-1}	–	–	–	+	+	+	+
10^{-2}	–	–	–	–	+	+	+
10^{-3}	–	–	–	–	–	+	+
10^{-4}	–	–	–	–	–	–	+
НВЧ/г	0	0,23	2,3	23	230	2400	∞
T_0	0	0,019	0,19	1,9	19	190	580
T_1	0,33	2,7	27	270	2700	30 000	∞
Если все испытания дали отрицательный результат, этот результат необходимо изложить как НВЧ = 0/г (верхний доверительный предел, T_1 0,33/г); если все испытания дали положительный результат, этот результат необходимо изложить как НВЧ = ∞ (нижний доверительный предел, T_0 580/г).							

10.2 Прецизионность

Межлабораторное совместное испытание, включающее полуколичественное определение *Campylobacter* spp., как описано в настоящем стандарте, было организовано в 2005 году Нордическим комитетом по анализу пищевых продуктов (NMKL). Испытание проводилось в 14 европейских лабораториях на сыром курином мясе и молоке. Каждая из проб пищевых продуктов была проанализирована при различных уровнях загрязнения плюс отрицательный контроль. Специфичность полуколичественного

метода составляла 100 %. Общая чувствительность метода была 82,1 %. Чувствительность обнаружения *Campylobacter* spp. в молоке была ниже, чем в курином мясе. Количественная оценка метода для *Campylobacter* spp. в курином мясе, полученная в этом совместном испытании, была совместима с диапазонами концентраций, приведенными в таблице 3.

11 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать по меньшей мере следующую информацию:

a) используемый метод отбора проб, если он известен;

b) используемый метод со ссылкой на настоящий стандарт;

c) используемая жидкая обогатительная среда;

d) используемая среда для изоляции;

e) выбранная температура инкубации;

f) полученные результаты испытаний;

g) все детали проведения испытаний, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые в качестве альтернативных, вместе с информацией о любых факторах, которые могли повлиять на результаты испытаний;

h) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы.

Приложение А
(обязательное)



Рисунок А.1 — Диаграмма методики

Приложение В
(обязательное)

Состав и приготовление питательных сред и реактивов

В.1 Бульон Болтона

В.1.1 Базовая среда

В.1.1.1 Состав

Продукт ферментативного переваривания животных тканей	10,0 г
Гидролизат лактальбумина	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия пируват	0,5 г
Натрия пиросульфит	0,5 г
Натрия карбонат	0,6 г
α-Кетоглутаровая кислота	1,0 г
Гемин [растворенный в 0,1 % (массовая доля) гидроксиде натрия]	0,01 г
Вода	1 000 $см^3$

В.1.1.2 Приготовление

Растворяют базовые компоненты или полную обезвоженную базовую среду в воде, при необходимости — путем нагрева. При необходимости корректируют pH, чтобы после стерилизации его значение для полной среды составляло 7,4 ± 0,2 ед. pH при температуре 25 °С. Разливают базовую среду в колбы подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве (6.1), установленном на температуру 121 °С, в течение 15 мин.

В.1.2 Стерильная лизированная дефибринированная кровь лошади

Используют кровь лошади, лизированную сапонином или замораживанием и последующим размораживанием.

В.1.3 Состав антибиотического раствора

Цефоперазон	0,02 г
Ванкомицин	0,02 г
Триметоприма лактат	0,02 г
Амфотерицин В	0,01 г
Смесь этанола и воды: 1 + 1 частей по объему	5 $см^3$

В.1.4 Приготовление

Растворяют компоненты в смеси этанола и воды (соотношение 1:1).

В.1.5 Полная среда

В.1.5.1 Состав

Базовая среда (В.1.1)	1 000 $см^3$
Стерильная лизированная дефибринированная кровь лошади (В.1.2)	50 $см^3$
Антибиотический раствор (В.1.3)	5 $см^3$

В.1.5.2 Приготовление

К базовой среде при температуре ниже 50 °С в стерильных условиях добавляют кровь, затем антибиотический раствор и перемешивают. Соблюдая стерильность, разливают среду в пробирки или колбы подходящей вмес-

тимости (см. 9.2.2), чтобы приготовить порции, необходимые для испытания. Если обогатительную среду приготовляют заранее, ее надо хранить не более 4 ч при комнатной температуре или не более 7 дней в темном месте при (3 ± 2) °С.

В.1.6 Эксплуатационное испытание

Эксплуатационные характеристики бульона Болтона (В.1.5.1) необходимо испытывать в соответствии с методами и критериями, описанными в ИСО/ТУ 11133-2. Примерами подходящих контрольных штаммов являются *C. jejuni* NCTC 11351 или ATCC 33291 со следующими критериями: > 10 колоний на mCCD агаре (5.3) после инкубации в микроаэробных условиях при 41,5 °С в течение (44 ± 4) ч.

В.2 Модифицированный агар с углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (mCCD агар)

В.2.1 Базовая среда

В.2.1.1 Состав

Мясной экстракт	10,0 г
Продукт ферментативного переваривания животных тканей	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Древесный уголь	4,0 г
Продукт ферментативного переваривания казеина	3,0 г
Дезоксихолат натрия	1,0 г
Железа(II) сульфат	0,25 г
Натрия пируват	0,25 г
Агар	8,0 г — 18,0 г[a)]
Вода	1 000 см^3
[a)] В зависимости от прочности геля агара.	

В.2.1.2 Приготовление

Растворяют базовые компоненты или полную обезвоженную базовую среду в воде путем доведения до кипения. При необходимости корректируют pH, чтобы после стерилизации его значение составляло 7,4 ± 0,2 ед. pH при температуре 25 °С. Разливают базовую среду в колбы подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве (6.1), установленном на 121 °С, в течение 15 мин.

В.2.2 Антибиотический раствор

В.2.2.1 Состав

Цефоперазон	0,032 г
Амфотерицин В	0,01 г
Вода	5 см^3

В.2.2.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде. Стерилизуют путем фильтрации.

В.2.3 Полная среда

В.2.3.1 Состав

Базовая среда (В.2.1)	1 000 см^3
Антибиотический раствор (В.2.2)	5 см^3

В.2.3.2 Приготовление

Добавляют антибиотический раствор к базовой среде, охлажденной до 47 °С—50 °С, затем тщательно перемешивают. Разливают около 15 см^3 полной среды по стерильным чашкам Петри. Дают затвердеть. Непосредственно перед применением тщательно высушивают слои агара, предпочтительно с открытыми крышками и поверхностью агара, направленной вниз, в сушильном шкафу (6.2) в течение 30 мин или до того момента, когда поверхность агара не будет содержать видимой влаги. Если они были приготовлены заранее, невысушенные агаро-

вые слои следует хранить не более 4 ч при температуре окружающей среды или не более 7 сут в темноте при температуре (3 ± 2) °С.

В.2.4 Эксплуатационное испытание

Для определения селективности или производительности см. ИСО/ТУ 11133-1. В отношении эксплуатационных критериев см. ИСО/ТУ 11133-2:2003, таблица В.5.

В.3 Колумбийский кровяной агар

В.3.1 Базовая среда

В.3.1.1 Состав

Продукт ферментативного переваривания животных тканей	23,0 г
Крахмал	1,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар	8,0 г — 18,0 г[a)]
Вода	1 000 см^3
[a)] В зависимости от прочности геля агара.	

В.3.1.2 Приготовление

Растворяют базовые компоненты или полную обезвоженную базовую среду в воде путем нагрева. При необходимости корректируют pH, чтобы после стерилизации его значение составляло 7,3 ± 0,2 ед. pH при температуре 25 °С. Разливают базовую среду в колбы подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве (6.1), установленном на температуру 121 °С, в течение 15 мин.

В.3.2 Стерильная дефибринированная баранья кровь

В.3.3 Полная среда

В.3.3.1 Состав

Базовая среда (В.3.1)	1 000 см^3
Стерильная дефибринированная баранья кровь (В.3.2)	50 см^3

В.3.3.2 Приготовление

Добавляют кровь в стерильных условиях к базовой среде, охлажденной до температуры 47 °С—50 °С, затем перемешивают. Разливают около 15 см^3 полной среды по стерильным чашкам Петри. Дают затвердеть. Непосредственно перед применением тщательно высушивают слои агара, предпочтительно с открытыми крышками и поверхностью агара, направленной вниз, в сушильном шкафу (6.2) в течение 30 мин или до того момента, когда поверхность агара не будет содержать видимой влаги. Если они были приготовлены заранее, невысушенные агаровые слои следует хранить не более 4 ч при температуре окружающей среды или не более 7 сут при температуре (3 ± 2) °С.

В.4 Бульон для бруцелл

В.4.1 Состав

Продукт ферментативного переваривания казеина	10,0 г
Продукт ферментативного переваривания животных тканей	10,0 г
Глюкоза	1,0 г
Дрожжевой экстракт	2,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия гидросульфит	0,1 г
Вода	1 000 см^3

В.4.2 Приготовление

Растворяют базовые компоненты или полную обезвоженную базовую среду в воде, при необходимости путем нагрева. При необходимости корректируют pH, чтобы после стерилизации его значение составляло 7,0 ± 0,2 ед. pH

при 25 °С. Разливают среду порциями по 10 $см^3$ в пробирки подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве (6.1), установленном на температуру 121 °С, в течение 15 мин.

В.5 Реактив для обнаружения оксидазы

В.5.1 Состав

N, *N*, *N'*, *N'*-Тетраметил-1,4-фенилендиамина дигидрохлорид	1,0 г
Вода	100 $см^3$

В.5.2 Приготовление

Растворяют компонент в воде непосредственно перед использованием.

В.6 Реактивы для обнаружения гидролиза гиппурата

В.6.1 Раствор гиппурата натрия

В.6.1.1 Состав

Натрия гиппурат	10 г
Фосфатно-буферный солевой раствор (PBS)	
Натрия хлорид	8,5 г
Динатрия гидрофосфат дигидрат ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	8,98 г
Натрия дигидрофосфат моногидрат ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	2,71 г
Вода	1 000 $см^3$

В.6.1.2 Приготовление

Растворяют гиппурат натрия в растворе PBS. Стерилизуют путем фильтрации. Разливают реактив в стерильных условиях порциями по 0,4 $см^3$ в небольшие пробирки подходящей вместимости (6.7). Хранят при температуре примерно 20 °С.

В.6.2 Раствор нингидрина, 3,5 % (масса на объем)

В.6.2.1 Состав

Нингидрин	1,75 г
Ацетон	25 $см^3$
Бутанол	25 $см^3$

В.6.2.2 Приготовление

Растворяют нингидрин в смеси ацетона и бутанола. Хранят раствор в холодильнике в темноте максимально в течение одной недели.

В.7 Кровяной агар Мюллера-Хинтона

В.7.1 Базовая среда

В.7.1.1 Состав

Продукт ферментативного переваривания животных тканей	6,0 г
Продукт ферментативного переваривания казеина	17,5 г
Крахмал, растворимый	1,5 г
Агар	8,0 г—18,0 г[a)]
Вода	1 000 $см^3$
[a)] В зависимости от прочности геля агара.	

В.7.1.2 Приготовление

Растворяют базовые компоненты или полную обезвоженную базовую среду в воде путем доведения до кипения. При необходимости корректируют pH, чтобы после стерилизации его значение составляло 7,3 ± 0,2 ед. pH при

температуре 25 °С. Разливают базовую среду в колбы подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве (6.1), установленном на температуру 121 °С, в течение 15 мин.

В.7.2 Стерильная дефибринированная баранья кровь

В.7.3 Полная среда

В.7.3.1 Состав

Базовая среда (В.7.1)	1 000 см^3
Стерильная дефибринированная баранья кровь (В.7.2)	50 см^3

В.7.3.2 Приготовление

Добавляют кровь в стерильных условиях к базовой среде, охлажденной до температуры 47 °С—50 °С, затем перемешивают. Разливают около 15 см^3 полной среды по стерильным чашкам Петри. Дают затвердеть. Непосредственно перед применением тщательно высушивают слои агара, предпочтительно с открытыми крышками и поверхностью агара, направленной вниз, в сушильном шкафу (6.2) в течение 30 мин или до того момента, когда поверхность агара не будет содержать видимой влаги. Если они были приготовлены заранее, невысушенные агаровые слои следует хранить не более 4 ч при температуре окружающей среды или не более 7 сут при температуре (3 ± 2) °С.

В.8 Диски с индоксилацетатом

В.8.1 Состав

Индоксилацетат	0,1 г
Ацетон	1 см^3

В.8.2 Приготовление

Растворяют индоксилацетат в ацетоне. Наносят от 25 мкл до 50 мкл этого раствора на чистые бумажные диски (диаметром от 6 мм до 12 мм). После высушивания при комнатной температуре хранят диски при температуре (3 ± 2) °С в коричневых пробирках или бутылках в присутствии силикагеля.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов и документов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам)

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта, документа	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 6887	—	*
ИСО 7218:2007	IDT	ГОСТ ISO 7218—2011 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям»
ИСО/ТУ 11133-1:2009	IDT	ГОСТ ISO 11133-1—2011 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории»
ИСО/ТУ 11133-2:2003	IDT	ГОСТ ISO 11133-2—2011 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред»

* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано условное обозначение степени соответствия стандартов:
- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] ISO 835 Посуда лабораторная стеклянная. Мерные градуированные пипетки

[2] ISO 7712 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки Пастера одноразового применения

[3] NKML Method No. 119, *Thermotolerant* Campylobacter — *Detection, semi-quantitative and quantitative determination in foods and drinking water.* Available (2009-06-09) from: http://shop.nmkl.org/

[4] Baylis, C.L., MacPhee, S., Martin, K.W., Humphrey, T.J., Betts, R.P. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 89, pp. 884—891

[5] Bolton, F.J., Hutchinson, D.N., Coates, D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J. Clin. Microbiol.* 1984, 19, pp. 169—171

[6] Bolton, F.J., Sails, A.D., Fox, A.J., Wareing, D.R., Greenway, D.L. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods by enrichment culture and polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food Prot.* 2002, 65, pp. 760—767

[7] Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M., editors. *Handbook of culture media for food microbiology*. Elsevier, Amsterdam, 2003 (*Progress in industrial microbiology*, Vol. 37)

[8] Hutchinson, D.N., Bolton, F.J. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* 1984, 37, pp. 956—957

[9] Josefsen, M.H., Lübeck, P.S., Aalbaek, B., Hoorfar, J. Preston and Park-Sanders protocols adapted for semi-quantitative isolation of thermotolerant *Campylobacter* from chicken rinse. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 80, pp. 177—183

[10] Rosenquist, H., Bengtsson, A., Hansen, T.B. A collaborative study on a Nordic standard protocol for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* in food (NMKL 119, 3. Ed., 2007). *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 118, pp. 201—213

УДК 663/664.777:006.354 ОКС 07.100.30 Н09

Ключевые слова: пищевые продукты, корма, микробиология, метод обнаружения, полуколичественный метод, презумптивные бактерии Campylobacter, культуральные среды, селективные среды, чашки Петри, инкубирование посевов, типичные колонии

Редактор *Е.В. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 11.07.2013. Подписано в печать 25.07.2013. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,70. Тираж 118 экз. Зак. 814.

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

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

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

gost.e-ecolog.ru