

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МИКРОБИОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ И ЖИВОТНЫХ КОРМОВ

Горизонтальный метод обнаружения и подсчета микроорганизмов Listeria monocytogenes

Часть 2. Метод подсчета

СТ РК ИСО 11290-2-2008

ISO 11290-2:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 2: Enumeration method, (IDT)

Издание официальное

Комитет по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан (Госстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН ТОО «Евразийский Консалтинговый Консорциум» на основе аутентичного перевода стандарта, указанного в п.3

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан от 26 ноября 2008 года № 600-од.

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 11290-2-1998 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета Listeria monosytogenes. Часть 2. Метод подсчета». При этом дополнительные положения, учитывающие потребности национальной экономики Республики Казахстан приведены в разделе 2, которые выделены курсивом

4 В настоящем стандарте реализованы нормы закона Республики Казахстан «О техническом регулировании»

5 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2013 год
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

Содержание

1	Область применения	1
2	Нормативные ссылки	1
3	Термины и определения	2
4	Общие положения	2
5	Питательные среды для микроорганизмов и реактивы	3
6	Аппаратура и стеклянная тара	3
7	Отбор проб	4
8	Методика	4
9	Обработка результатов	9
10	Погрешность	11
11	Проверка качества культурных сред	11
12	Протокол испытаний	11
Приложение А (обязательное) Схема методики		12
Приложение Б (обязательное) Составление и приготовление сред и реактивов		13
Приложение В (справочное) Испытание освещением по Генри		20
Приложение (справочное) Библиография		21

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МИКРОБИОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ И ЖИВОТНЫХ КОРМОВ

Горизонтальный метод обнаружения и подсчета микроорганизмов Listeria monocytogenes Часть 2 Метод подсчета

Дата введения 2009-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт определяет горизонтальный метод подсчета Listeria monocytogenes.

Примечание - Также метод позволяет перечислить виды Listeria, которые могут использоваться в качестве индикаторов санитарной нормы продуктов или продуктов питания.

Предупреждение - В целях охраны здоровья персонала лаборатории, настоятельно рекомендуется, чтобы испытания по обнаружению Listeria monocytogenes проводились в тщательно оборудованных лабораториях под контролем квалифицированного микробиолога и с особой осторожностью в использовании размещенных веществ. В частности, настоятельно рекомендуется, чтобы персонал лаборатории женского пола был предупрежден об особом риске для развития плода, в случае, если инфекция передана от матери при подвергании воздействию Listeria monocytogenes.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

СТ РК 1.9-2007 Государственная система технического регулирования Республики Казахстан. Порядок применения международных, региональных и национальных стандартов иностранных государств, других нормативных документов по стандартизации в Республике Казахстан.

ИСО 6887-99 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятичных разведений. *

ИСО 7218-2007 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Общие требования и руководство по исследованиям. *

ИСО 11290-1-96 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета *Listeria monocytogenes.* Часть 1. Метод обнаружения. *

* *Применяется в соответствии с СТ РК 1.9.*

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

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

3.2 **Подсчет Listeria monocytogenes:** Определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) Listeria monocytogenes в предоставленном количестве вещества при проведенном анализе в соответствии с настоящим стандартом.

4 Общие положения

В настоящем стандарте подсчет Listeria monocytogenes требует шести последовательных этапов. Графическое представление подсчета Listeria monocytogenes приведено в приложении А.

4.1 Приготовление исходной суспензии в одном из двух описанных разбавителей, по необходимости.

4.2 Оживление микроорганизмов в течение 1 ч при температуре 20 °С.

4.3 Разметочная плита на твердой селективной питательной среде для микроорганизмов, содержащейся в двух чашках Петри установленного количества испытательной пробы для жидких веществ или исходной суспензии для других веществ.

Подготовка других чашек с пробой в аналогичных условиях с использованием десятичных разбавлений испытательной пробы или исходной суспензии.

4.4 Выдерживание чашек с пробой в термостате при температуре от 35 °С до 37 °С и контроль после 24 - 48 ч.

4.5 Соответствие предполагаемых колоний Listeria monocytogenes с описанными испытаниями.

4.6 Производится подсчет количества Listeria monocytogenes на грамм или миллилитр испытательной пробы из количества подтвержденных колоний.

Нижний предел подсчета настоящего метода равен 10 L monocytogenes на миллиметр пробы жидких веществ, либо 100 Listeria monocytogenes на грамм пробы других веществ.

5 Питательные среды для микроорганизмов и реактивы

Питательные среды для микроорганизмов и реактивы, используемые для определения Listeria monocytogenes, установлены в ИСО 7218, приложении Б настоящего стандарта.

6 Аппаратура и стеклянная тара

Соответствующее микробиологическое оборудование по ИСО 7218 и, в частности, нижеследующее.

6.1 Аппарат для сухой стерилизации (печь) или стерилизации паром (автоклав)

6.2 Сушильная камера или инкубатор, работающий при температуре между (25 ± 1) °С и (50 ± 1) °С.

6.3 Инкубаторы (термостаты) для поддержания модифицированной среды, чашки с пробой и пробирки в пределах температуры:

- (20 ± 1) °С (дополнительно);
- (25 ± 1) °С (дополнительно);
- (35 ± 1) °С или (37 ± 1) °С.

6.4 Водяная баня, допускающая поддержание температуры при 44 - 47 °С.

6.5 Петли и проволоки из платины/иридия/никеля/хрома, либо пастерки или одноразовые петли.

6.6 Стеклянный или пластмассовый распылители, стерильные.

6.7 Измеритель кислотности, измеряющий минимальный показатель pH 0,01 при температуре 25 °С, дающий возможность провести измерения с точностью до ± 0,1 показателя pH.

6.8 Пробирки или колбы подходящей емкости для стерилизации и поддержания питательной среды микроорганизмов.

6.9 Пипетки со шкалой для выпуска воды номинальной емкости 1 мл и 10 мл, с соответственно градуированными делениями от 0,1 мл до 0,5 мл.

6.10 Чашки Петри диаметром 90 мм и 140 мм.

6.11 Сосуды, подходящие для микроаэробного выращивания микроорганизмов (дополнительно).

6.12 Газовая смесь (дополнительно) определенного состава для микроаэробного выращивания микроорганизмов: от 5 % до 12 % CO_2, от 5 % до 15 % O_2 и N_2 до 100 %.

6.13 Оборудование для испытания освещением по Генри (дополнительно).

6.14 Микроскоп предпочтительно с фазовым контрастом.

6.15 Часы.

7 Отбор проб

В лабораторию должны доставляться пробы необходимого образца, не поврежденные или замененные во время транспортировки или хранения по ИСО 7218.

8 Методика

8.1 Рабочая часть образца, исходная суспензия и растворы по ИСО 6887-1, а также нормативные документы на конкретный вид содержимого вещества.

Растворитель используются для приготовления исходной суспензии или буферной пептонной воды (см. Б.1 приложения Б), либо для основной питательной среды полу-Фрейзера (см. Б.2 приложения Б).

Питательная основа полу-Фрейзера без добавления селективных химических средств может использоваться в качестве растворителя для пробы продуктов и корма для животных при применении обоих методов обнаружения в соответствии ИСО 11290-1 и настоящего метода подсчета к одной и той же испытательной пробе. Настоящая методика не избегает необходимости приготовления двух исходных суспензий; селективные химические средства добавляются в суспензию один раз на рабочую часть образца для осуществляемого подсчета. Использование настоящего метода должно быть занесено в протокол испытаний.

Исходная суспензия настаивается (60 ± 5) мин при температуре (20 ± 2) °С [при использовании термостата, при необходимости 6.3 первое перчисление)] для оживления погибших микроорганизмов.

8.2 Введение живых микроорганизмов в питательную среду и их выращивание

8.2.1 С помощью стерильной пипетки (см. 6.9) перемещают 0,1 мл исходной суспензии (8.1) в каждую из двух чашек агарных в соответствии с Оттавиани и Агости (Б.3), заранее высушенных в термостате, при необходимости (см. 6.2).

Процедуру повторяют с использованием десятичных разбавлений, при необходимости.

Примечание - При необходимости подсчета небольшого количества Listeria monocytogenes в определенном веществе предел подсчета может снижаться коэффициентом 10, при исследовании 1,0 мл исходной суспензии. 1 мл посевного материала распределяют либо по поверхности агаровой среды в большой чашке Петри (140 мм), либо по поверхности агаровой среды в трех или шести маленьких чашках (90 мм), используя стерильный распылитель (см. 6.6). В обоих случаях подготавливают дублеты, используя две большие или шесть маленьких чашек.

8.2.2 Осторожно распределяют посевной материал по поверхности чашки с агаровой средой как можно быстрее, не задевая края чашки распылителем. Для каждой чашки используют чистый стерильный распылитель*. Чашки оставляют накрытыми примерно на 15 мин при температуре (20 ± 2) °С для того, чтобы посевной материал впитался в агар.

8.2.3 Подготовленные по 8.2.2 чашки переворачивают и помещают их термостат [6.3 третье перечисление)], при установленной температуре 35 °С или 37°С.

8.3 Подсчет характерных колоний

8.3.1 После выращивания микроорганизмов в течение 24 часов и дополнительно 18-24 часов, если их развитие проистекает медленно или по истечении 24 часов выращивания колоний не наблюдается, проверяют чашки (см. 8.2.3) на наличие предполагаемых колоний вида Listeria (см. 8.3.3).

8.3.2 Зеленовато-голубые колонии, окруженные не прозрачным ореолом (типичные колонии), принимают за Listeria monocytogenes. Если рост не значительный или если никакие колонии не наблюдаются или, если после 24 ± 3 ч выращивания, не присутствуют никакие типичные колонии, в чашки делают повторный засев еще на 24 ± 3 ч.

Примечание

1 Некоторые штаммы Listeria monocytogenes показывают очень слабый ореол в случаях стресса, в частности, кислотного стресса.

2 Некоторые Listeria monocytogenes характеризуются медленной активностью PIPLC (фосфатидилинозитолом фосфолипазой С). Такие бактерии обнаруживаются, когда полная продолжительность выращивания, составляет, например, более 4дней. Некоторые из таких штаммов могут быть патогенными ([1]).

8.3.3 Подсчитывают все предполагаемых колонии *Listeria* (см. 8.3.3) в каждой чашке, содержащей менее 150 характерных и нехарактерных колоний.

8.4 Подтверждение вида Listeria

8.4.1 Отбор колоний для подтверждения

8.4.1.1 После выращивания (см. 8.3.1) чашки, в которых содержится менее 150 колоний предполагаемого вида *Listeria*, во всех растворах, если возможно, в двух последовательных растворах выбирают пять предполагаемых колоний, содержащихся в каждой чашке. Если набирается меньше пяти предполагаемых колоний в каждой чашке, для подтверждения выбирают все предполагаемые колонии.

8.4.1.2 Выбранные колонии размещают штрихом на поверхности предварительно высушенных чашках с агаром (TSYEA) дрожжевого экстракта триптона соевой культуры (см. Б.4 Приложения Б) таким образом, чтобы позволить развиваться тщательно разделенным колониям.

---

* Допустимо использование одного и того же распылителя для данной пробы, начиная с усиленного растворения.

Примечание - Тест Генри на освещение может проводиться при необходимости (см. приложение С и примечание в В.4.2 приложения В). Колонии приобретают синеватый цвет с зернистой поверхностью.

Чашки помещают в термостат [см. 6.3 третье перечисление)] с температурой 35 °С или 37 °С на 18 ч или до достаточного развития.

8.4.2 Реакция каталаза

Отделенную колонию по 8.4.1.2 разбавляют в капле раствора пероксида водорода (Б.10) на предметном стекле. Незамедлительное образование газовых пузырьков указывает на положительную реакцию (см. ИСО 7218).

8.4.3 Окрашивание по Грамму

Выполняют окрашивание по Граму по ИСО 7218 колонии, отделенную по 8.4.1.2. Вид Listeria обнаруживается как тонкие грамположительные короткие палочки (диаметром приблизительно от 0,4 до 0,5 мкм и длиной от 1 до 2 мкм).

8.4.4 Испытание на подвижность*

Отделенную в 8.4.1.2 колонию, и разбавляют в пробирке с TSYEB (см. Б.5 приложения Б).

Выращивают в термостате [см. 6.3 второе перечисление)] при 25 °С в течение 8-24 часов до появления мутной среды.

Каплю полученной культуры, как указано выше, помещают в петлю (см. 6.5) на предметное стекло микроскопа. Покровное стекло помещают наверх и исследуют через микроскоп (см. 6.14). Вид Listeria появляется в виде тонких, коротких палочек, находящихся в беспорядочном движении.

Культуры, выросшие при температуре выше 25 °С могут не показать подобного движения. Их всегда сравнивают с культурами, свойства которых изучены. Кокки, большие палочки или палочки с мгновенной плавательной подвижностью известны как вид Listeria.

В качестве альтернативного испытания на подвижность с использованием иглы для посева микроорганизмов (см. 6.5), укалыванием помещают в агар подвижности (см. Б.8 приложения Б) TSYEA характерную колонию (см. 8.4.1.2). Выращивают микроорганизмы в течение 48 ч в термостате [см. 6.3 второе перечисление] при 25 °С.

Развитие микроорганизмов исследуют вокруг укалывания. Вид Listeria подвижны, зонтичной формы роста, растущие прямо над поверхностью агара. Если рост развивается недостаточно, микроорганизмы выращивают дополнительно в течение 5 дней и проверяют культуру во это время.

8.5 Подтверждение Listeria monocytogenes

8.5.1 Испытание гемолиза

8.5.1.1 Если морфологические и физиологические характеристики и реакция каталаза указывают вид Listeria, определяют гемолитическую реакцию на овечий кровяной агар в чашках (см. Б.6 приложения Б).

---

* Настоящая проверка не обязательна, если анализ проведен микробиологом, который регулярно работает над обнаружением Listeria monocytogenes.

Перед использованием тщательно высушивают поверхность с кровяным агаром, затем размечают агар в виде квадратов. Для каждой культуры берут колонию, отделенную по 8.4.1.2 и помещают один из помеченных квадратов с помощью проволоки (см. 6.5). Также помещают положительные (Listeria monocytogenes) и отрицательные (Listeria innocua) элементы культуры.

После выращивания при температуре 37 °С в течение (24 ± 2) ч проверяют испытательные породы и элементы. Listeria monocytogenes проявляются в виде узких, четких, светлых зон β-гемолиза*; Listeria innocua не проявляются в виде четких зон вокруг укалывания. Listeria seeligeri проявляются в виде нечеткой зоны β-гемолиза. Listeria ivanovii проявляются в виде широких, четких зон β-гемолиза. Проверяют чашки по прозрачности для сравнения испытательных пород и элементов.

8.5.1.2 Гемолитическая реакция также может проявиться при осуществлении испытания CAMP (см. 8.5.3), либо при использовании красных сосудов с суспензией, как изложено далее. Распределяют колонию в 150 микролитров TSYEB (см. Б.5 приложения Б); выращивают при температуре 37 °С в течение 2 часов. Добавляют 150 микролитров суспензию красных кровяных клеток овечьей крови (см. Б.12 приложения Б). Выращивают при температуре 37 °С в течение 15 - 60 мин, затем замораживают при температуре (3 ± 2) °С около 2 ч. Проверяют на присутствие или отсутствие β-гемолиза. Если реакции не выявилось, оставляют культуру при температуре (3 ± 2) °С до 2 ч.

8.5.2 Утилизация углерода

Используя петлю (см. 6.5), модифицируют каждый случай использования питательной среды углерода (см. Б.7) с культурой из TSYEB (см. 8.4.4). Выращивание производится при температуре 37 °С до 5 дней. Положительные реакции, то есть образование кислот или кислоты указывается изменением цвета от фиолетового до желтого, проявляющегося в пределах (от 24 до 48) ч.

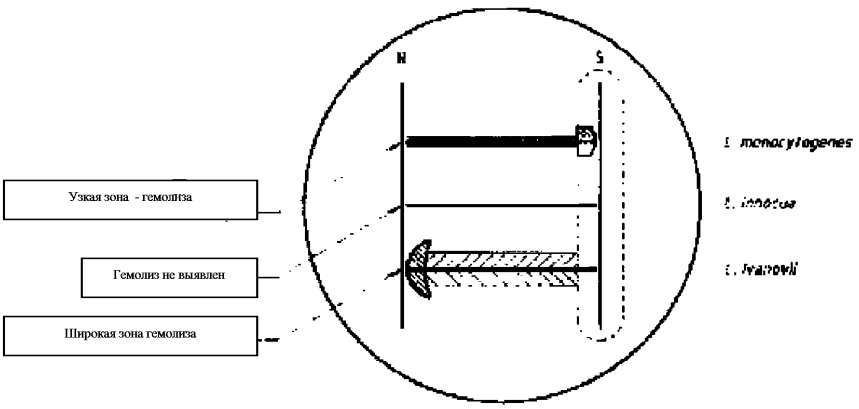
8.5.3 Испытание CAMP

Каждую из культур Staphylococcus aureus Rhodococcus equi (см. Б.9.4 приложения Б) высаживают штрихом отдельными рядами поперек чашки с овечьим кровяным агаром (см. Б.6 или Б.9.3 приложения Б) таким образом, чтобы две культуры были параллельны и прямо противоположны (см. рисунок 1). Необходимо получить прореженную посевную культуру. Этого можно достичь, используя петлю или проволоку для внесения посевного материала (см. 6.5), держа под прямыми углами относительно агара.

Испытательный элемент, отделенный по 8.4.1.2, высаживают штрих подобным способом под прямым углом относительно данных культур таким

*Зона β-гемолиза видима более четко при передвижении колоний, развивающихся на поверхности агара вокруг метки для посевной культуры.

образом, чтобы не затронуть испытательные культуры и культуры Staphylococcus aureus и Rhodococcus equi, а на расстоянии около от 1 до 2 мм. В одну чашку можно высадить несколько испытательных культур.



Примечание

1 Плоские чашки с кровяным агаром (см. Б.6 или Б.9. приложения Б) рассаживают, как показано на схеме. Вертикальные линии представляют собой полоски S. aureus (S) и R. equi (R). Горизонтальные линии представляют собой полоски испытательных культур. Заштрихованные участки указывают положение усиленного гемолиза.

2 Пунктирный участок указывает зону влияния культуры S. aureus.

Рисунок 1 – Модифицирование и интерпретация чашек для испытания CAMP

Полоски культур Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Listeria ivanovii контролируется одновременно. Если используется кровяной агар (см. Б.6 приложения Б), культуры в чашках выращивают при температуре 37 ˚С в течение (от 12 до18) ч.

Расширенная зона β-гемолиза в месте пересечения испытательной полоски с культурами Staphylococcus aureus и Rhodococcus equi рассматривается как положительная реакция.

Положительная реакция с Rhodococcus equi представлена в виде широкого (от 5 до 10 мм) «острия стрелки» гемолиза. Реакция считается отрицательной, если малая зона слабого гемолиза протягивается только на 1 мм в месте пересечения испытательной полоски с диффузионной зоной культуры Rhodococcus equi.

Положительная реакция с Staphylococcus aureus проявляется в виде небольшой зоны усиленного гемолиза, протягивающейся только около от 3 до 4 мм от испытательной полосы и в зоне слабого гемолиза до зоны развития культуры Staphylococcus aureus. Большие зоны β-гемолиза не появляются в соседней зоне между Staphylococcus aureus и Listeria monocytogenes.

8.6 Интерпретация морфологических и физиологических свойств и биохимических реакций

Все виды Listeria маленькие, грамположительные палочки, обладающие подвижностью (см. 8.4.4), при освещении по Генри они синеватого цвета с зернистой поверхностью. В общем плане они обладают положительной каталазой.

Listeria monocytogenes отличаются от других видов по характеристикам, перечисленным в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 – Реакции для идентификации Listeria spp

Вид	Гемолиз	Получение кислоты		Испытание CAMP	
		Рамноза	Ксилоза	*S. aureus*	*R. equi*
Listeria monocytogenes	+	+	-	+	-
Listeria innocua	-	V	-	-	-
Listeria ivanovii	+	-	+	-	+
Listeria seeligeri	(+)	-	+	(+)	-
Listeria welshimeri	-	V	+	-	-
Listeria grayi	-	-	-	-	-
где V - изменчивая реакция; «(+)» - слабая реакция; «+» - > 90 % положительных реакций; «-» - без реакции					
Примечание - Существуют редкие штаммы Listeria monocytogenes, которые не показывают β – гемолиз или положительную реакцию на тест CAMP согласно условиям, изложенным в настоящем стандарте					

8.7 Окончательное подтверждение

Штаммы, которые рассматривают на принадлежность к Listeria monocytogenes (см. 8.6) могут быть отправлены в поверочную (справочную) лабораторию по распознанию Listeria для серологического или, возможно, лизогенного типирования, либо альтернативного достоверного молекулярного метода типирования. Выполнение должно сопровождаться всей возможной информацией, относительно штамма (-ов).

9 Обработка результатов

Обработка результатов проводится в соответствии с ИСО 7218.

9.1 Подсчет колоний Listeria monocytogenes

Для каждой чашки Петри вычисляют количество *a* присутствующих колоний *Listeria monocytogenes*, используя следующую формулу:

$$a = \frac{b}{A} \cdot C \qquad (1)$$

где b – число колоний, соответствующих критериям идентификации (9.6);

A – число колоний, выделенных для подтверждения (см. 9.4.1.1);

C – общее число характерных колоний, подсчитанных на чашке (см. 9.3.4).

Округляют a до целого числа.

9.2 Метод подсчета

9.2.1 Чашки Петри, содержащие менее 150 колоний Listeria monocytogenes, каждая из которых содержит не менее 15 Listeria monocytogenes

Подсчитывают число N Listeria monocytogenes, присутствующих в 1 мл или 1 г продукта, используя следующую формулу:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0{,}1n_2)\,d} \qquad (2)$$

где $\sum a$ – сумма колоний L. monocytogenes, подсчитанного после подтверждения, во всех сосудах, удерживаемые на протяжении двух последовательных разбавлений, одно из которых содержит, по меньше мере, 15 идентифицированных колоний;

V – объем инокулята, используемого для каждого сосуда, мм

n_1 – количество сосудов, удерживаемых при первом разбавлении;

n_2 – количество сосудов, удерживаемых при втором разбавлении;

d – коэффициент разбавления, который относится к первому удержанному разбавлению.

Округляют результаты, полученные для двух значительных диаграмм по ИСО 7218.

Берут в качестве результата число Listeria monocytogenes на 1 миллилитр (продукты в жидком виде) или на 1 грамм (продукты другого вида), выраженное в качестве численного значения между 1,0 и 9,9 и умноженное на 10 в соответствующей степени.

Примечание - В качестве примера см. ИСО 7218.

9.2.2 Приблизительный подсчет небольших численных значений

9.2.2.1 Если два сосуда на уровне начальной приостановки, содержат меньше 15 колоний Listeria monocytogenes, то с использованием формулы, указанной в 9.1, подсчитывают количество подтвержденных колоний в каждом сосуде. Также вычисляют среднее арифметическое y каждой колонии в двух сосудах.

Результаты выражают следующим образом:

- приблизительное число Listeria monocytogenes на 1 грамм или миллилитр

$$N_E = \frac{y}{d \cdot V} \quad (3)$$

где d – коэффициент разбавления начальной суспензии;

V – объем инокулята каждого сосуда.

9.2.2.2 Если два сосуда на уровне начального взвешивания не содержат каких-либо колоний, то результаты выражают следующим образом:

- меньше чем $\frac{1}{d \cdot V}$ Listeria monocytogenes на 1 г (мм).

где, d – коэффициент разбавления начальной суспензии;

V – объем инокулята в каждом сосуде.

10 Погрешность

Погрешность метода определяется в соответствии с ИСО 7218.

11 Проверка качества культурных сред

Проверяют способность культурных сред поддерживать избирательный (селективный) рост Listeria monocytogenes, как изложено ниже. Вводят разведение эталонной (контрольной) культуры незадолго до этого изолированных штаммов Listeria monocytogenes и отрицательных контрольных штаммов (например, лактобацилл, стрептококков) в контрольной колбе селективной питательной среды первичного обогащения (см. 8.2). Добавляют 10 - 100 клеток Listeria monocytogenes или отрицательных контрольных штаммов на колбу.

Продолжают исследование с контрольными колбами, в отношении испытательных культур, чтобы показать, что обнаружена положительная контрольная культура.

12 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать используемый метод, температуру культивирования и полученные результаты. А также содержать все операционные детали, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые в качестве не обязательных, вместе с особенностями любых случайностей (инцидентов), которые могли повлиять на результаты.

В протоколе испытаний должна содержаться все информация, необходимая для полной идентификации образца.

Приложение А
(обязательное)

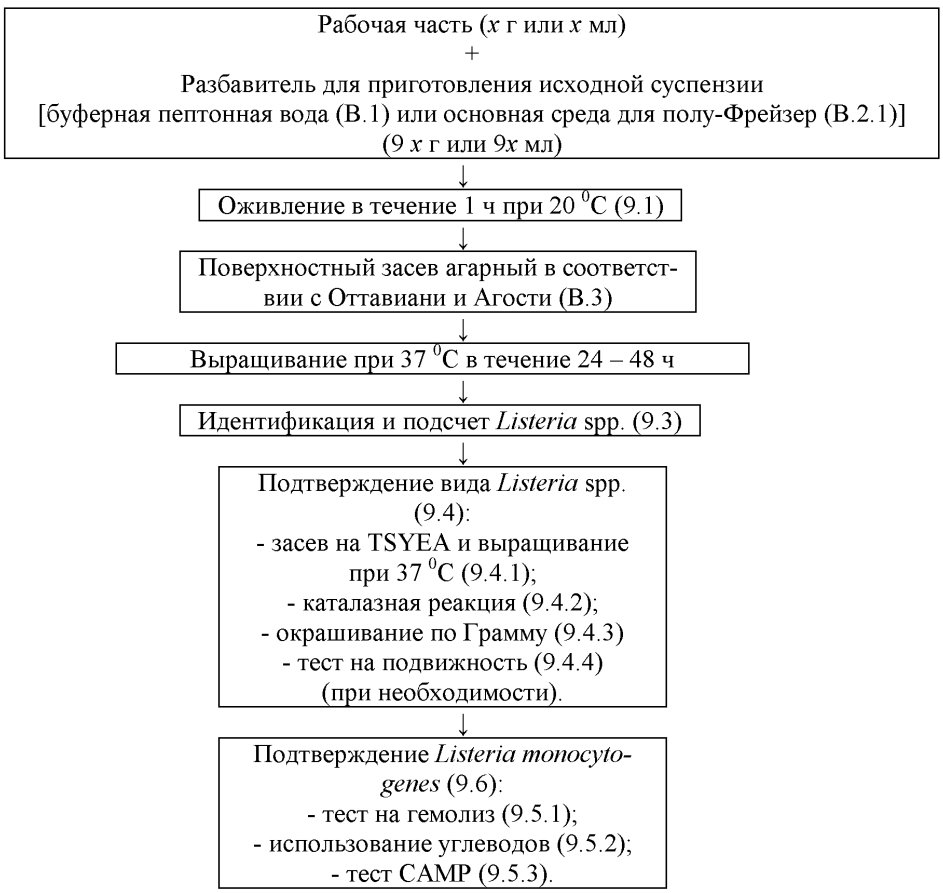


Рисунок А.1 - Схема методики

Приложение Б
(обязательное)

Составление и приготовление сред и реактивов

Б.1 Буферная пептонная вода

Б.1.1 Состав:

- ферментный продукт переваривания животных тканей - 10,0 г;
- хлорид натрия (NaCl) - 5,0 г;
- додекагидрат двузамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) - 9,0 г;
- дигидрофосфат калия (KH_2PO_4) - 1,5 г;
- вода - 1000 мл.

Б.1.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, нагреванием, при необходимости.

Регулируют pH по 6.7, при необходимости, так, чтобы после стерилизации, он составлял 7,0 ± 0,2 при 25 °С.

Среду распределяют по колбам (см. 6.8) соответствующей емкости с целью получения доз (порций), соответствующих для проведения теста (см. 9.1).

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве (6.1), установленном при 121 °С.

Б.2 Питательная основа полу-Фрейзера с железом (III) - аммониевым цитратом (ИСО 11290-1)

Б.2.1 Питательная основа полу-Фрейзера

Б.2.1.1 Состав:

- ферментный продукт переваривания животных тканей - 5,0 г;
- ферментный продукт переваривания казеина - 5,0 г;
- мясной экстракт - 5,0 г;
- дрожжевой экстракт - 5,0 г;
- хлорид натрия (NaCl) - 20,0 г;
- додекагидрат двузамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) - 12,0 г;
- дигидрофосфат калия (KH_2PO_4) - 1,35 г;
- эскулин - 1,0 г;
- вода - 1000 мл.

Б.2.1.2 Приготовление

Компоненты или обезвоженную полную основу растворяют в воде, нагреванием, при необходимости.

Регулируют pH, при необходимости, так, чтобы после стерилизации, он составлял 7,2 ± 0,2 при 25 ^{0}С.

Среду распределяют по колбам (см. 6.8) соответствующей емкости с целью получения доз, соответствующих для проведения теста (см 9.1).

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве (см. 6.1), установленном при 121 ^{0}С.

Б.2.2 Раствор железо (III) - аммониевого цитрата

Б.2.2.1 Состав:

- железо (III) -аммониевый цитрат - 5,0 г;
- вода - 100 мл.

Б.2.2.2 Приготовление

Железо (III) - аммониевый цитрат растворяют в воде.

Стерилизуют фильтрацией.

Б.2.3 Приготовление среды

Непосредственно перед использованием, добавляют 1,0 мл раствора железо (III) - аммониевого цитрата (Б.2.2) к каждой 100 мл дозе питательной основе полу-Фрейзера (Б.2.1).

Б.3 Агарная Listeria в соответствии с Оттавиани и Агости (ALOA*)

Б.3.1 Основа из агара

Б.3.1.1 Состав:

- Ферментный продукт переваривания тканей - 18 г;
- Ферментный продукт переваривания казеина - 6 г;
- Дрожжевой экстаркт - 10 г;
- Натрий пируват - 2 г;
- Глюкоза - 2 г;
- Глицерофосфат магния - 1 г;
- Сульфат магния (безводный) - 0,5 г;
- Хлорид натрия - 5 г;
- Хлорид лития - 10 г;
- Дигидрофосфат натрия (бехводный) - 2,5 г;
- 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-глюкопиранозид - 0,05 г
- Агар- 12-18г[а]
- Вода - 930 мл[в]

Примечание

1 [а)] В зависимости о прочности геля агара.

2 [в)] 925 мл, если используется раствор амфотерицина В (см. В.3.5.2 приложения В).

Б.3.1.2 Приготовление

Растворяют безводные компоненты или безводную полную основу в кипяченной воде.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве, установленном при 121 ^{0}С.

pH регулируют при необходимости, так чтобы после стерилизации, он составлял 7,2 ± 0,2.

Б.3.2 Раствор налидиксовой кислоты:

- налидиксовая кислота - 0,02 г;
- гидрооксид натрия (0,05 моль/л) - 100 мл.

Натриевую соль налидиксовой кислоты растворяют в 5 мл гидроксида натрия и стерилизуют фильтрованием.

Б.3.3 Раствор цефтазидима:

- цефтазидим - 0,02 г;
- вода - 5 мл.

Цефтазидим растворяют в 5 мл воды и стерилизуют фильтрованием через 0,45 мкм мембрану.

Б.3.4 Раствор поликмисина В

- сульфат полимиксина В - 76700 МЕ;
- вода - 5 мл.

Полимиксин В растворяют в 5 мл воды. Стерилизуют фильтрованием через 0,45 мкм мембрану.

Б.3.5 Добавка антибиотика

Б.3.5.1 Раствор циклогексимида

- циклогексимид - 0,05 г;

---

* ALOA является примером соответствующей среды, имеющейся на рынке. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта. Допускается использование другой среды с таким же составом.

- этанол - 2,5 мл;
- вода - 2,5 мл.

Циклогексимид растворяют в 2,5 мл этанола, затем добавляют 2,5 мл воды. Стерилизуют фильтрованием через 0,45 мкм мембрану.

Б.3.5.2 Раствор амфотерицина В (в качестве альтернативы раствора циклогексимида):

- амфотерицин - 0,01 г;
- HCl (1 моль/л) - 2,5 мл;
- диметилформамид (DMF) - 7,5 мл.

Амфотерицин растворяют в растворе HCl/DMF. Стерилизуют фильтрованием через 0,45мкм мембрану.

П р е д у п р е ж д е н и е - Раствор HCl/DMF является токсичным, обращаться с ним с осторожностью.

Б.3.6 Добавка

Растворяют 2 г L-α-фосфатидилинозитол (Сигма. Р 6636®*) в 50 мл холодной воды.

Размешивают в течение около 30 мин до тех пор, пока не получится гомогенная суспензия.

Автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин и охлаждают до 48-80 °С.

Б.3.7 Полная среда

Б.3.7.1 Состав

Основная среда (см. Б.3.1 приложения Б) - 930 мл[a];
- раствор налидиксовой кислоты (см. Б.3.2 приложения Б) - 5 мл;
- раствор цефтазидима (см. Б.3.3 приложения Б) - 5 мл;
- раствор полимиксина В (см. Б.3.4 приложения Б) - 5 мл;
- раствор циклогексимида (см. Б.3.5.1 приложения Б) - 5мл;

или раствор амфотерицина В (см. Б.3.5.2 приложения Б) - 10 мл;
- добавка - 50 мл.

П р и м е ч а н и е – [a)] 925 мл, если используется раствор амфотерицина В.

Б.3.7.2 Приготовление

Растворы добавляют к расплавленной основе при 50 °С, тщательно перемешивая между каждым добавлением.

pH полной среды должен составлять 7,2 ± 0,2 при 25 °С.

Среда должна быть непрозрачной.

Б.3.7.3 Приготовление чашек с агаровой средой

Помещают в каждую чашку Петри 15-20 мл свежеприготовленной полной среды, затем дают застыть.

Б.4 Твердая питательная среда для культур (культурная среда): Триптоносоевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA)

Б.4.1 Состав:
- ферментный продукт переваривания казеина - 17,0 г;
- ферментный продукт переваривания соевой муки - 3,0 г;
-хлорид натрия (NaCl) - 5,0 г;
-вторичный кислый фосфат калия (K_2HPO_4) - 2,5 г
- D-глюказа - 2,5 г;

* Р 3363 является торговым названием изделия, поставляемого Сигмой. Эта информация дается для удобства пользователей настоящей стандарта. Эквивалентные изделия могут быть использованы, если может быть показано, что они приводят к аналогичным результатам.

-дрожжевой экстракт - 6 г;

- агар - 9 – 18 г[1)];

- вода - 1000 мл

Примечание - [1)] В зависимости от прочности геля агара.

Б.4.2 Приготовление

Компоненты или обезвоженную полную среду растворяют в кипяченой воде.

Регулируют pH, при необходимости, так, чтобы после стерилизации, он составлял 7,3 ± 0,2 при 25 ^{0}C.

Среду распределяют по пробиркам соответствующей емкости с целью получения доз, соответствующих для проведения испытания.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве, установленном при 121 ^{0}C.

Дают затвердеть в наклонном положении.

Для приготовления чашек с агаровой средой, среду распределяют в стерильные чашки Петри, дозами, соответствующими для испытания. Дают застыть.

Примечание - Если проводится испытание освещением по Генри, важно, чтобы слой агаровой среды был тонким (приблизительно 12 мл на чашку диаметром 90 мм).

Б.5 Жидкая питательная среда для культур (культурная среда): Триптоновосоевая жидкая среда с дрожжевым экстрактом (TSYEB)

Б.5.1 Состав:

- ферментный продукт переваривания казеина - 17,0 г;
- ферментный продукт переваривания соевой муки - 3,0 г;
- хлорид натрия (NaCl) - 5,0 г;
-вторичный кислый фосфат калия (K_2HPO_4) - 2,5 г;
- D – глюкоза - 2,5 г;
- дрожжевой экстракт - 6 г;
- вода - 1000 мл.

Б.5.2 Приготовление

При необходимости компоненты или обезвоженную полную среду растворяют в кипяченой воде.

Регулируют pH, при необходимости, так, чтобы после стерилизации, он составлял 7,3 ± 0,2 при 25 ^{0}C.

Среду распределяют по пробиркам соответствующей емкости с целью получения доз, соответствующих для испытания.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве, установленном при 121 ^{0}C.

Б.6 Овечье кровяной агар

Б.6.1 Основа

Б.6.1.1 Состав

- ферментный продукт переваривания животных тканей - 15 г;
- ферментный продукт переваривания печени - 2,5 г;
- дрожжевой экстракт - 5 г;
- хлорид натрия (NaCl) - 5 г;
- агар - от 9 до 18 г*
- вода - 1000 мл.

Б.6.1.2 Приготовление

Компоненты или обезвоженную полную среду растворяют в воде, кипячением.

Регулируют pH, при необходимости, так, чтобы после стерилизации, он составлял 7,2 ± 0,2 при 25 ^{0}C.

Среду распределяют по колбам соответствующей емкости с целью получения доз, соответствующих испытанию.

---

* В зависимости от прочности геля агара.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве, установленном при 121 ^{0}С.

Б.6.2 Полная основа

Б.6.2.1 Состав

- основа (В.6.1) - 100 мл;
- дефибринированная овечья кровь – от 5 до 7 мл.

Б.6.2.2 Приготовление

Кровь добавляют к основе, предварительно охлажденной до 47 ^{0}С. Хорошо перемешивают.

Среду распределяют по стерильным чашкам Петри, соответствующих испытанию.

Б.7 Жидкая (питательная) среда с использованием углеводов (рамнозы и ксилозы)

Б.7.1 Основа

Б.7.1.1 Состав:

- ферментный продукт переваривания животных тканей - 10 г;
- мясной экстракт - 1 г;
- хлорид натрия (NaCl) - 5 г;
- бромкрезоловый пурпурный (краситель) - 0,02 г;
- вода - 1000 мл.

Б.7.1.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, нагреванием, если необходимо.

Регулируют pH, при необходимости, так, чтобы после стерилизации, он составлял 6,8 ± 0,2 при 25 ^{0}С.

Среду распределяют по пробиркам соответствующей емкости с целью получения доз, соответствующих испытанию.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве, установленном при 121 ^{0}С.

Б.7.2 Растворы углеводов

Б.7.2.1 Состав

- углевод* - 5 г;
- вода - 100 мл.

Б.7.2.2 Приготовление

Каждый углевод по отдельности растворяют в 100 мл воды.

Стерилизуют фильтрованием.

Б.7.3 Полная среда

Для каждого углевода, асептически добавляют *x* мл раствора В.7.2 основы (см. В.7.1).

Б.8 Подвижный агар

Б.8.1 Состав:

- ферментный продукт переваривания казеина - 20,0 г;
- ферментный продукт переваривания животных тканей - 6,1 г;
- агар - 3,5 г;
- вода - 1000 мл.

Б.8.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, нагреванием.

Регулируют pH, при необходимости, так, чтобы после стерилизации, он составлял 7,3 ± 0,2 при 25 ^{0}С.

Среду распределяют по пробиркам в количествах приблизительно 5 мл.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве, установленном при 121 ^{0}С.

---

* L-рамноза или D-ксилоза.

Б.9 Среда CAMP (Кристи, Аткинс, Манч-Патерсон) и опытные штаммы

Для настоящего испытания могут быть использованы чашки со средой из овечьего кровяного агара (см. Б.6 приложения Б), но предпочтительно использовать чашки с двойным слоем агара и очень тонким слоем среды из овечьей крови (см. Б.9.3 приложения Б).

Б.9.1 Основа в соответствии с Б.6.1.

Б.9.2 Среда из овечьей крови (овечье-кровяной агар) в соответствии с Б.6.2.

Б.9.3 Полная среда

Основу (см. Б.9.1 приложения Б) распределяют по стерильным чашкам Петри, в количестве, приблизительно, 12 мл на чашку Петри диаметром 90 мм и дают застыть. Равномерно наливают очень тонким слоем среду из овечьей крови (см. Б.9.2 приложения Б), используя количества, не превышающие 3 мл на 1 чашку. Дают застыть.

Если кровяная среда добавляется к чашкам, содержащим основу, которая была приготовлена заранее, может потребоваться мытье чашек в течение 20 мин, поместив их в термостат, установленный при 37 ^{0}C перед заливанием слоя кровяной среды.

Б.9.4 Штаммы, реагирующие на CAMP

Для β – гемолитического штамма S. aureus (напр., NCTC 1803 или ATCC 25923), штамма *R. equi* (например, NCTC 1621 или ATCC 6939) и штамма L. monocytogenes (напр., NCTC 11994) необходимо провести испытание CAMP. Не все штаммы S. aureus и L. monocytogenes подходят для испытания CAMP.

Исходные культуры S. aureus, R. equi, L. monocytogenes, L. innocua, и L. ivanovii поддерживают путем засева на скошенные питательные среды TSYEA (Б.4), выращивая их при (36 – 37) ^{0}C в течение 24 – 28 ч или до возникновения роста и храня в холодильнике при (3 ± 2) ^{0}C. Делают пересев не менее 1 раза в месяц и подтверждают их чистоту штриховой разводкой на чашки TSYEA (Б.4).

Б.10 Раствор перекиси водорода

Используют 3 % (***m/m***), т.е. 10 объемный раствор.

Б.11 Фосфатно-солевой буферный раствор (добавочный)

Б.11.1 Состав:

- додекагидрат двузамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) - 8,98 г;
- вторичный кислый фосфат натрия ($Na_2H_2PO_4$) - 2,71 г;
- хлорид натрия (NaCl) - 8,5 г;
- вода - 1000 мл.

Б.11.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде.

Регулируют pH, при необходимости, так, чтобы после стерилизации, он составлял 7,2 ± 0,2 при 25 ^{0}C.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве, установленном при 121 ^{0}C.

Б.12 Суспензия из эритроцитов крови овцы (добавочная)

До использования, клетки крови овцы хранят при 93 ± 2 ^{0}C.

Перед использованием изучают на признаки гемолиза (перед покраснением) в верхнем слое сыворотки.

Если никакой гемолиз не присутствует, вводят 2 мл нижнего слоя эритроцитов в 98 мл буферного раствора PBS (фосфатно-солевого буферного раствора) (см. Б.11 приложения Б).

Если произошел некоторый гемолиз, суспендируют около 4 мл слоя эритроцитов в 10 мл буферного раствора PBS и осторожно перемешивают, затем центрифугируют. Если надосадочная жидкость заметно покраснела из-за значительного гемолиза, то суспензию исходного раствора не используют, а выбрасывают. В противном случае надосадочную жидкость декантируют и добавляют 2 мл этой суспензии клеток к 98 мл буферного раствора PBS.

Суспензию хранят до 5 дней при (3 ± 0,2) ^{0}C. В случае возникновения какого-либо гемолиза, выбрасывают.

Приложение В
(справочное)

Испытание освещением по Генри

Чашки Петри изучают, используя источник лучей белого цвета, достаточного мощного для хорошего освещения чашек, ударяющегося дно чашки под углом 45 ^{0} (рисунок В.1). При изучении под наклонно проходящим светом (освещение Генри) от источника непосредственно над чашкой, колонии Listeria spp демонстрируют синеватый (голубоватый) цвет и зернистую поверхность.

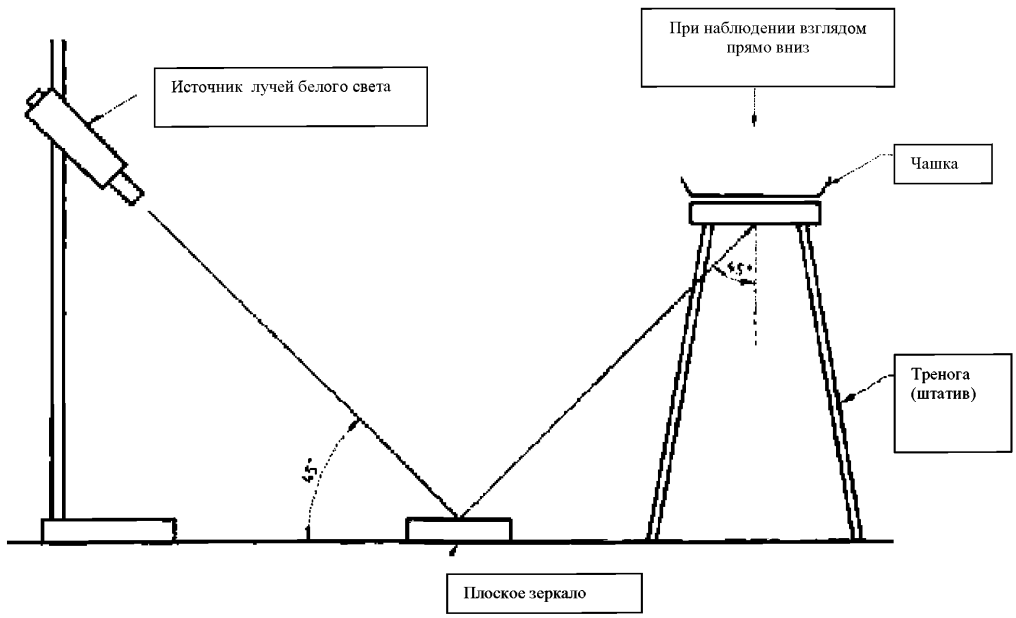


Рисунок В.1 – Изучение чашек на предполагаемые (подозрительные) колонии

Приложение
(справочное)

Библиография

[1] Леклерк А. Атипичная морфология колоний и слабое выделение штаммов Listeria monocytogenes. Оксфорд, PALCAM, Rapid'L.моно и твердая среда ALOA. Журнал микробиологических методов, 57, 2004 г.

УДК 579.67:663/.664:636.085:579.869.1:001.891.5:006.354 МКС 67.050

Ключевые слова: микроорганизмы, Listeria monocytogenes, метод подсчета, выращивание, агар, питательная основа Полу-Фрейзера, колонии микроорганизмов, раствор,

Басуға _____ ж. қол қойылды Пішімі 60х84 1/16
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,
«Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана. Тапсырыс ____

«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты»
республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы, Орынбор көшесі, 11 үй,
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8 (7172) 240074

gost.e-ecolog.ru