МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO/TS 21872-1— 2013

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальный метод обнаружения потенциально энтеропатогенных Vibrio spp.

Часть 1

Обнаружение бактерий Vibrio parahaemoliticus и Vibrio cholerae

(ISO/TS 21872-1:2007, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0–92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИКОП Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 декабря 2013 г. № 63-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу ISO/TS 21872-1:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. — Part 1: Detection of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения потенциально энтеропатогенных видов рода Vibrio. Часть 1: Выявление бактерий Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae).

Международный документ разработан подкомитетом ISO/TC 34/SC 9 «Микробиология» Технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного документа, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеется в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 17 марта 2014 г. № 157-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO/TS 21872-1–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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, 2014

В Российской Федерации 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 Сущность метода 2
4.1 Общие положения 2
4.2 Первичное обогащение в селективной жидкой среде 2
4.3 Вторичное обогащение в жидкой селективной среде 2
4.4 Выделение и идентификация 2
4.5 Подтверждение 3
5 Реактивы и среды 3
5.2 Плотные среды для выделения 3
5.2.2 Вторая среда 3
6 Аппаратура и материалы 3
7 Отбор проб 4
8 Приготовление испытуемой пробы 4
9 Проведение испытания (см. приложение А) 4
9.1 Проба для испытания и исходная суспензия 4
9.2 Первичное селективное обогащение 4
9.3 Вторичное селективное обогащение 4
9.4 Выявление и идентификация 4
9.5 Подтверждение 5
10 Выражение результатов 8
11 Протокол испытаний 8
Приложение А (обязательное) Схема проведения испытания 9
Приложение В (обязательное) Состав и приготовление питательных сред и реактивов 10
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам 14
Библиография 15

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальный метод обнаружения потенциально энтеропатогенных Vibrio spp

Часть 1

Обнаружение бактерий Vibrio parahaemoliticus и Vibrio cholerae

Microbiology of food and animal feeding stuffs.
Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp.
Part 1. Detection of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae

Дата введения — 2015—07—01

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Для гарантии здоровья лабораторного персонала необходимо, чтобы тесты для выявления Vibrio spp. и особенно токсигенного Vibrio cholerae проводились только в лабораториях, специально оснащенных для этих целей, и под руководством опытного микробиолога, и чтобы уделялось особое внимание обеззараживанию зараженного материала.

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и корма для животных и устанавливает горизонтальный метод выявления двух главных патогенных видов Vibrio, вызывающих кишечные болезни у человека: Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae.

Метод применим также для выявления данных микроорганизмов в объектах окружающей среды в сфере пищевого производства и оборота пищевых продуктов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ISO 6887-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений)

ISO 6887-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила подготовки мяса и мясных продуктов)

ISO 6887-3 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов)

Издание официальное

ISO 6887-4 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для приготовления продуктов, кроме молока и молочных продуктов, мяса и мясных продуктов и рыбы и рыбопродуктов)

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

ISO 8261 Milk and milk products. General guidance for the preparation of tests samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination (Молоко и молочные продукты — Общие правила приготовления проб для испытаний, исходных суспензий и десятикратных разведений для микробиологических исследований)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **потенциально энтеропатогенные Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae:** Микроорганизмы, которые образуют типичные колонии на плотной селективной среде и которые обладают описанными биохимическими характеристиками при проведении испытания в соответствии с настоящим стандартом.

3.2 **обнаружение потенциально энтеропатогенных Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae:** Определение присутствия или отсутствия Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae в определенном количестве продукта, после проведения испытания в соответствии с настоящим стандартом.

4 Сущность метода

4.1 Общие положения

Метод обнаружения Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae состоит из четырех последовательных этапов (см. также приложение А).

Примечание — Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae могут присутствовать в небольших количествах, часто вместе с гораздо большим количеством других микроорганизмов, относящихся к семейству Vibrionaceae или к другим семействам, поэтому два последовательных обогащения необходимы для выявления определяемых микроорганизмов.

4.2 Первичное обогащение в селективной жидкой среде

Среду для обогащения (щелочную солевую пептонную воду, ASPW) (5.1) инокулируют навеской при комнатной температуре. Посевы инкубируют при 37 °С в течение (6 ± 1) ч для глубоко замороженных продуктов или при 41,5 °С в течение (6 ± 1) ч. для свежих продуктов.

4.3 Вторичное обогащение в жидкой селективной среде

Среду для обогащения (ASPW) инокулируют культурой, полученной по 4.2. Посевы инкубируют при 41,5 °С в течение (18 ± 1) ч.

4.4 Выделение и идентификация

Культуры, полученные по 4.2 и 4.3, пересевают на две селективные плотные среды:

- тиосульфат, цитратный, желчный, сахарозый (TCBS) агар;
- другая плотная селективная среда выбирается параллельно среде TCBS, позволяющей выделить Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae.

Посевы на среде TCBS инкубируют при 37 °С, посевы просматривают через (24 ± 3) ч. Посевы на второй селективной среде инкубируют в соответствии с рекомендациями изготовителя этой среды.

4.5 Подтверждение

Типичные колонии Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae, выделенные по 4.4, пересевают и затем подтверждают с помощью биохимических тестов.

5 Реактивы и среды

Примечание — В связи с большим количеством питательных сред и реагентов и для удобства пользования их состав и приготовление представлены в приложении В.

5.1 Среда для обогащения: щелочная солевая пептонная вода (ASPW) См. В.1.

5.2 Плотные среды для выделения

5.2.1 Первая среда: тиосульфат, цитратный, желчный, сахарозный (TCBS) агар; см. В.2.

5.2.2 Вторая среда

Выбор второй среды остается за выбором лаборатории, проводящей тест. Приготовление среды должно строго соответствовать инструкциям изготовителя этой среды.

Примечание — Соя пептон трифенил тетразолий хлорид агар (TSAT) и натрия додецил сульфат, полимиксин, сахароза агар (SDSPS), (mCPC, CPC, CC) агары не рекомендуются для выделения Vibrio parahaemolyticus.

5.3 Солевой питательный агар (SNA)
См. В.3.
5.4 Реактив для определения оксидазы
См. В.4.
5.5 Солевой трехсахарный железистый (TSA) агар
См. В.5.
5.6 Солевая среда для определения орнитин декарбоксилазы (ODC)
См. В.6.
5.7 Солевая среда для определения лизин декарбоксилазы (LDC)
См. В.7.
5.8 Солевая среда для определения аргинин дегидролазы (ADH)
См. В.8.
5.9 Реактив для определения β-галактозидазы
См. В.9.
5.10 Солевая среда для определения индола
См. В.10.
5.11 Солевые пептонные воды
См. В.11.
5.12 Раствор хлорида натрия
См. В.12.

6 Аппаратура и материалы

Примечание — Инструменты одноразового применения — приемлемая альтернатива стеклянной посуде многократного пользования, если они имеют подходящие технические характеристики.

Оборудование обычной микробиологической лаборатории (см. ISO 7218) и, в частности, следующее:

6.1 Термостат, регулируемый до (37 ± 1) °С.
6.2 Термостаты или водяные бани, регулируемые до (41,5 ± 1) °С.
6.3 Водяная баня, регулируемая от 44 °С до 47 °С.
6.4 Водяная баня, регулируемая до (37 ± 1) °С.

Рекомендуется использовать водяные бани (6.2, 6.3 и 6.4), содержащие антибактериальный агент.

7 Отбор проб

Важно, чтобы для испытания в лабораторию поступила представительная проба, не поврежденная и не измененная в ходе транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Отбор проб — по стандарту на конкретный продукт. В случае отсутствия конкретного стандарта на отбор проб продукта рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по процедуре отбора проб.

8 Приготовление испытуемой пробы

Пробу для испытания готовят в соответствии с определенной частью ISO 6887 и/или ISO 8261 или стандарту на конкретный продукт. В случае отсутствия конкретного стандарта рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по данному вопросу.

9 Проведение испытания (см. приложение А)

9.1 Проба для испытания и исходная суспензия

Для приготовления исходной суспензии используют первую среду для обогащения (ASPW), указанную в 5.1.

Берут пробу для испытания (х г, или х $см^3$) в соответствии с требованиями, указанными на конкретный продукт, и гомогенизируют ее в 9х $см^3$ (или 9х г) среды для обогащения.

В случае больших количеств высеваемого продукта перед внесением навески ASPW должна быть нагрета до 37 °С.

Если разведение продукта и инкубирование посевов не могут быть проведены в тот же день, исходную суспензию хранят до следующего дня при температуре (5 ± 3) °С.

Для уменьшения объема проводимой работы пробы могут быть объединены в случае, когда более чем одна проба (25 г) испытывается от той же партии анализируемого пищевого продукта и когда есть уверенность в том, что смесь (собранные вместе порции пробы) не изменят конечные результаты, связанные с этим продуктом.

Пример — Если анализируют 10 проб для испытаний массой 25 г, возможно их объединение для того, чтобы получить в сумме объединенную пробу массой 250 г и добавить к ней 2,25 $дм^3$ среды для обогащения.

Количество клеток Vibrio parahaemolyticus и Vibrio cholerae значительно снижается за счет хранения при низких температурах. Хранение проб и в меньшей степени суспензий при таких температурах должно быть устранено или сведено к минимуму.

9.2 Первичное селективное обогащение

Инкубируют исходную суспензию (9.1) при 37 °С в течение (6 ± 1) ч для глубоко замороженных, сушеных или соленых продуктов или при 41,5 °С в течение (6 ± 1 ч) для свежих продуктов.

Необходимо особое внимание к применению метода для продуктов с высоким содержанием соли, так как конечная концентрация соли в среде может изменять ее качественные характеристики (см. ISO 6887-4).

9.3 Вторичное селективное обогащение

9.3.1 Переносят 1 $см^3$ культуры, полученной по 9.2, взятой с поверхности, в пробирку, содержащую 10 $см^3$ ASPW (5.1).

9.3.2 Посевы по 9.3.1 инкубируют при 41,5 °С в течение (18 ± 1) ч.

9.4 Выявление и идентификация

9.4.1 Культурами, выросшими на среде ASPW (9.2 и 9.3.2), засевают петлей поверхность чашек с TCBS агаром (5.2.1) так, чтобы обеспечить рост хорошо изолированных колоний.

Аналогично поступают со второй селективной средой (5.2), используя новую петлю (после фламбирования).

9.4.2 Переворачивают чашки Петри с посевами. Чашки с посевами на TCBS агар (9.4.1) помещают в термостат (6.1), установленный на 37 °С. Посевы на вторую селективную среду инкубируют, следуя инструкции изготовителя.

9.4.3 После инкубирования посевов (9.4.1 и 9.4.2) в течение (24 ± 3) ч их просматривают на наличие типичных колоний предположительно патогенных Vibrio spp., отмечают их расположение на дне чашки Петри.

Существуют две основные морфологические характеристики для колоний Vibrio spp. на TCBS агар:

- типичные колонии V. parahaemolyticus гладкие зеленые (сахарозоотрицательные), от 2 до 3 мм в диаметре;
- типичные колонии V. cholerae гладкие, желтые (сахарозоположительные), от 2 до 3 мм в диаметре.

Вторую селективную среду инкубируют при соответствующей температуре в течение соответствующего периода времени, затем проверяют на наличие колоний, которые в соответствии с их характеристиками могут быть отнесены к возможно выделенным V. parahaemolyticus и V. Cholera.

9.5 Подтверждение

9.5.1 Для идентификации Vibrio до вида могут быть использованы разнообразные коммерчески доступные наборы для биохимической идентификации, обеспеченные базой данных или идентификационными таблицами. Наборы инокулируются суспензией определяемых бактерий. Суспензии для инокуляции готовятся в физиологическом растворе или жидкости для разбавления. Наборы для биохимической идентификации основаны на реакциях, полученных при использовании сред, аналогичным тем, которые описаны в настоящем стандарте. Данные наборы следует использовать в соответствии с требованиями инструкций изготовителей.

Примечание — Распознавание колоний Vibrio в значительной степени вопрос опыта, их внешний вид может иногда различаться в зависимости не только от вида, а также от партии питательной среды.

9.5.2 Отбор колоний для подтверждения и приготовления чистых культур

Для подтверждения пересевают с каждой селективной среды (см. 9.4) по меньшей мере пять колоний, которые считаются типичными для каждого потенциально патогенного вида Vibrio spp. (V. parahaemolyticus, V. cholerae). Если на чашке менее пяти типичных колоний, то пересевают все эти колонии.

Примечание — Пищевые продукты, особенно морепродукты, могут содержать большое число бактерий, включая непатогенные Vibrio spp., которые могут расти в процессе культивирования на селективных средах. Пересев малого количества колоний может привести к потере потенциально патогенных видов.

Пересевают отобранные колонии на поверхность чашек с солевым питательным агаром или поверхность скошенного солевого питательного агара (5.3) для получения изолированных колоний. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение (24 ± 3) ч.

Для биохимического подтверждения используют чистые культуры.

9.5.3 Тесты для идентификации

9.5.3.1 Тест на оксидазу

Используя петлю из платиново-иридиевого провода или стеклянный стержень, отбирают часть чистой культуры с солевого питательного агара (9.5.2) и проводят по поверхности фильтровальной бумаги, увлажненной реактивом на оксидазу (5.4), или используют коммерческие диски или растворы, следуя инструкциям изготовителя. Не допускается использовать никель-хромовую петлю для отбора или металлическую проволоку. Тест считается положительным, если цвет меняется на розовато-лиловый, фиолетовый или насыщенный фиолетовый в течение 10 с.

9.5.3.2 Микроскопирование

Каждую чистую культуру, полученную по 9.4.2, тестируют в соответствии с a) и b) как указано далее.

a) Готовят мазок для окраски по Граму. После окраски, используя микроскоп, проверяют морфологию и отношение к окраске по Граму.

b) Инокулируют пробирку с щелочной солевой пептонной водой (ASPW) (5.1). Посев инкубируют при 37 °С от 1 ч до 6 ч. Наносят каплю культуры на чистую поверхность предметного стекла, накры-

вают покровным стеклом и проверяют подвижность культуры под микроскопом. Отбирают культуры, которые показали положительный результат на подвижность.

9.5.3.3 Отбор культур для биохимических тестов

Отбирают для биохимического подтверждения оксидазоположительные, грамотрицательные культуры, которые показывают положительный результат в тесте на подвижность.

9.5.4 Биохимическое подтверждение

9.5.4.1 Используя петлю для посевов, инокулируют среды, указанные в 9.5.4.2 — 9.5.4.8 каждой культурой, полученной из колоний, отобранных по 9.5.3.3.

9.5.4.2 Тест с солевым TSI агаром (5.5)

Инокулируют укалыванием основание столбика агара и проводят вдоль по скошенной поверхности. Посевы инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 3) ч.

Результаты интерпретируют следующим образом:

a) Столбик плотной среды:

- желтый: глюкозо-положительный (ферментация глюкозы);
- красный или неизменившийся: глюкозо-отрицательный (нет ферментации глюкозы);
- черный: образование сероводорода;
- пузыри или трещины: образование газа из глюкозы.

b) Скошенная поверхность плотной среды

- желтый: лактозо и/или сахарозо-положительный (ферментация лактозы и/или сахарозы);
- красный или неизменившийся: лактозо и сахарозо-отрицательный (нет ферментации лактозы или сахарозы).

Типичные реакции для Vibrio parahaemolyticus соответствуют щелочной поверхности (красный цвет среды) и кислотному основанию (желтый цвет среды), без образования сероводорода или газа.

Типичные реакции для Vibrio cholerae соответствуют кислотной поверхности (желтый цвет среды) и кислому основанию (желтый цвет среды) без образования сероводорода или газа.

Инкубирование не должно превышать 24 ч, так как желтая поверхность V. cholerae может через 24 ч преобразоваться в красную.

9.5.4.3 Определение орнитин декарбоксилазы

Инокулируют жидкую солевую среду (5.6) чуть ниже поверхности. Добавляют около 1 $см^3$ стерильного минерального масла на поверхность среды. Посевы инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 3) ч.

Помутнение и фиолетовый цвет среды после термостатирования указывают на положительную реакцию (бактериальный рост и декарбоксилирование орнитина). Желтый цвет показывает отрицательную реакцию.

9.5.4.4 Определение L-лизин декарбоксилазы

Инокулируют жидкую солевую среду (5.7) чуть ниже поверхности. Добавляют около 1 $см^3$ стерильного минерального масла на поверхность среды. Посевы инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 3) ч.

Помутнение и фиолетовый цвет после инкубирования указывают на положительную реакцию (бактериальный рост и декарбоксилирование лизина). Желтый цвет указывает на отрицательную реакцию.

9.5.4.5 Определение аргинин дигидролазы

Инокулируют жидкую солевую среду (5.8) чуть ниже поверхности. Добавляют около 1 $см^3$ стерильного минерального масла на поверхность среды. Посевы инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 3) ч.

Помутнение и фиолетовый цвет после инкубирования указывают на положительную реакцию (бактериальный рост и дигидрирование аргинина). Желтый цвет указывает на отрицательную реакцию.

9.5.4.6 Определение β-галактозидазы

Инокулируют подозрительную колонию в пробирку, содержащую 0,25 $см^3$ солевого раствора (5.12). Добавляют одну каплю толуола и встряхивают пробирку.

Помещают пробирку в водяную баню (6.4), установленную на 37 °С и оставляют ее приблизительно на 5 мин.

Добавляют 0,25 $см^3$ реактива для определения β-галактозидазы (5.9) и перемешивают, после чего пробирку возвращают в водяную баню, установленную на 37 °С, оставляют ее на (24 ± 3) ч, проверяя время от времени.

Желтый цвет указывает на положительную реакцию (присутствие β-галактозидазы). Часто реакция видна через 20 мин. Отсутствие окрашивания через 24 ч указывает на отрицательную реакцию.

Если используются диски, готовые к применению, то следуют инструкциям изготовителя.

9.5.4.7 Определение индола

Подозрительную колонию засевают в пробирку с 5 $см^3$ триптон-триптофановой солевой среды (5.10). Посевы инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 3) ч. После инкубирования добавляют 1 $см^3$ реактива Ковача.

Образование красного кольца указывает на положительную реакцию (образование индола). Желто-коричневое кольцо указывает на отрицательную реакцию.

9.5.4.8 Тест на солеустойчивость

Готовят серию сред с пептонной водой (5.11) с возрастающей концентрацией соли (NaCl): 0, 2, 4, 6, 8 и 10 %.

Готовят суспензию из колоний, которые будут тестироваться, и засевают каждую из пробирок (с помощью петли). Посевы инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 3) ч.

Появление помутнения указывает на то, что подозреваемая колония может расти при концентрации хлорида натрия, в соответствующей пробирке с солевой пептонной водой.

9.5.4.9 Интерпретация биохимических тестов

Виды V. parahaemolyticus, V. cholerae в основном дают реакции, представленные в таблице 1.

Таблица 1 — Интерпретация биохимических тестов

Тесты (среды, содержащие 1 % NaCl)	V. cholerae[a]	V. parahaemolyticus[a]
Оксидаза	+	+
Выделение газа (глюкоза)	–	–
Лактоза	–	–
Сахароза	+	–
ODC	+	+
LDC	+	+
ADH	–	–
ONPG гидролиз	+	–
Образование индола	+	+
Рост в пептонной воде с:		
0 % NaCl	+	–
2 % NaCl	+	+
6 % NaCl	–	+
8 % NaCl	–	+
10 % NaCl	–	–

[a] Знак «+» означает от 76 % до 89 % положительных реакций.

Примечание — Реакции, приведенные в Таблице 1, — руководство к идентификации перечисленных видов. Требуются дополнительные фенотипические тесты для полного различения этих видов друг от друга, от других непатогенных видов Vibrio и от других ферментативных грамотрицательных организмов, таких как Aeromonas spp. Vibrio mimicus, патогенных видов, указанных в ISO/TS 21872-2, так как показывают идентичные реакции с V. cholerae в этой серии тестов. Кроме того, что они являются сахарозоотрицательными.

9.5.4.10 Пошаговое подтверждение (по желанию)

С культурами, отобранными в 9.5.3.3, проводят тесты на рост в 10 %-ной солевой пептонной воде (5.11) и аргинин дегидролазу (5.8). Другие подтверждающие тесты проводят со всеми колониями, которые не показали рост в 10 %-ной солевой пептонной воде и которые дают отрицательную реакцию на аргинин дегидролазу.

Примечание — Желательно в то же время делать пересев либо в 2 %-ную солевую пептонную воду, либо на солевой питательный агар, для того, чтобы быть уверенным, что «отсутствие роста» в 10 %-ной солевой пептонной воде не вызвано гибелью культуры.

9.5.5 Подтверждение биохимической идентификации и определение факторов патогенности

Биохимическая идентификация Vibrio трудна, желательно получить подтверждение выявления V. parahaemolyticus, V. cholerae в специализированной лаборатории. В этом случае для транспортирования колонии пересевают на поверхность скошенного солевого питательного агара (5.3).

Не все виды V. parahaemolyticus и V. cholerae являются патогенными. Для того, чтобы подтвердить патогенный характер видов, предпочтительнее проводить серологические тесты для V. cholerae (по крайней мере, чтобы определить, являются ли они серогрупами О1 или О139) и обнаружить присутствие токсинообразования или токсигенных генов для V. cholerae и термостабильно направленного гемолизина (TDH) или TDH-родственных гемолизиновых генов для V. parahaemolyticus. Эти тесты следует проводить в специализированной лаборатории. Следует отметить, что соотношение патогенных видов в окружающей среде и образцах пищевых продуктов обычно невелико (для V. parahaemolyticus они обычно присутствуют приблизительно в 1 % от общего содержания V. parahaemolyticus в образце) и, таким образом, вероятность обнаружения патогенных видов с помощью пересева небольшого количества колоний для идентификации и подтверждения очень низка.

10 Выражение результатов

В зависимости от результатов интерпретации указывают присутствие или отсутствие потенциально энтеропатогенных Vibrio spp. в пробе для испытания х г или х $см^3$ продукта (см. ISO 7218), указав название соответствующих бактериальных видов.

11 Протокол испытаний

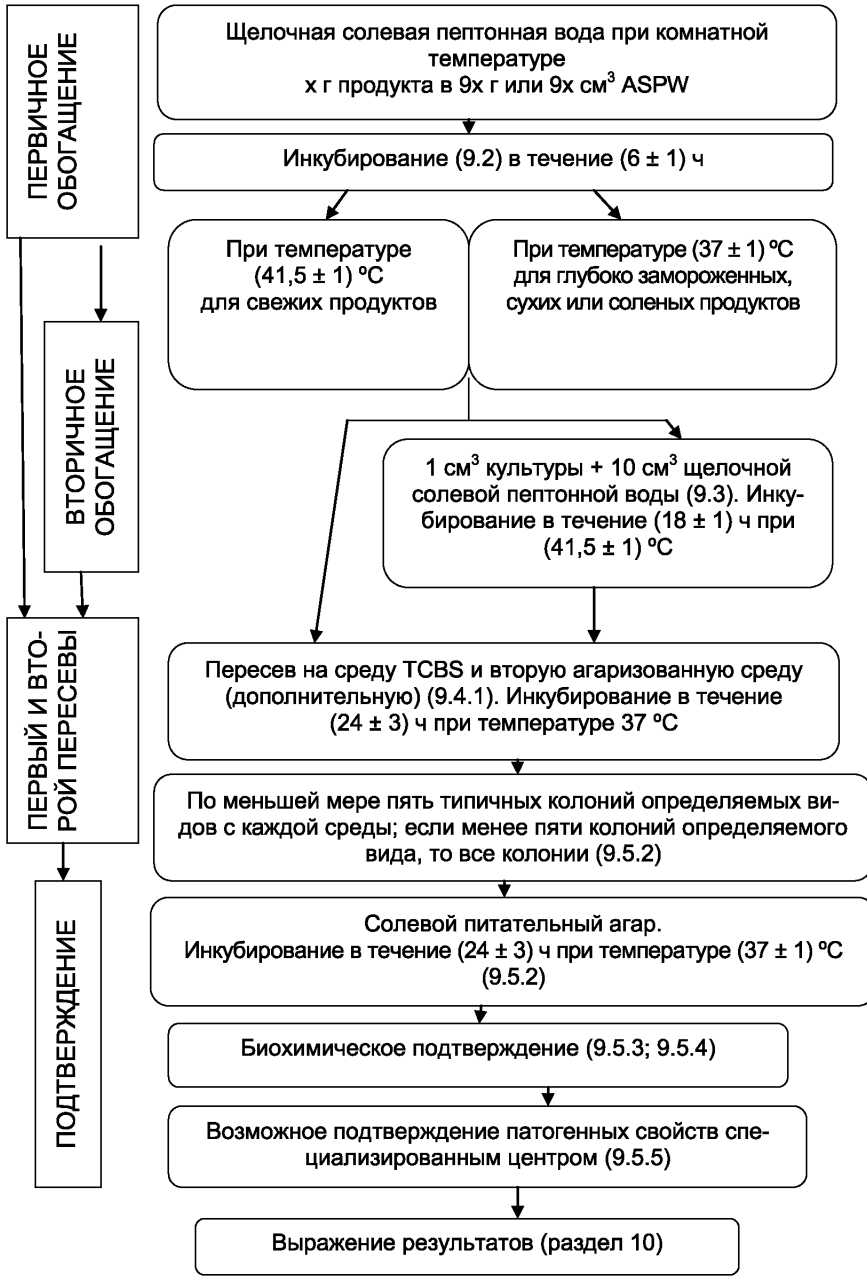
Протокол испытаний должен содержать:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- используемый метод отбора проб, если он известен;
- любое отклонение в плане характеристик среды для обогащения или использованных условий инкубирования;
- все рабочие детали, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые как дополнительные, вместе с деталями любых инцидентов, которые могли бы повлиять на результат испытаний;
- полученные результаты и, в частности, информация о том, была ли подтверждена патогенность изолированных видов.

Протокол испытаний должен также содержать информацию о том, были ли получены положительные результаты только при использовании среды для изоляции (5.2), не указанной в настоящем стандарте.

Приложение А
(обязательное)

Схема проведения испытания



Приложение В
(обязательное)

Состав и приготовление питательных сред и реактивов

В.1 Щелочная солевая пептонная вода (ASPW)

В.1.1 Состав:
пептон — 20,0 г;
натрия хлорид — 20,0 г;
вода — 1000 см^3

В.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, нагревая при необходимости. Если необходимо, регулируют pH так, чтобы после стерилизации он составлял 8,6 ± 0,2 при 25 °С.

Разливают среду в пробирки или колбы подходящего объема, чтобы получить порции, в количествах, требуемых для анализа (см. 9.1; 9.3.1). Стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С.

В.2 Тиосульфат, цитратный, желчный, сахарозный (TCBS) агар

В.2.1 Состав:
пептон — 10,0 г;
дрожжевой экстракт — 5,0 г;
цитрат натрия — 10,0 г;
тиосульфат натрия — 10,0 г;
цитрат железа (iii) — 1,0 г;
хлорид натрия — 10,0 г;
сухая бычья желчь — 8,0 г;
сахароза — 20,0 г;
бромтимоловый голубой — 0,04 г;
тимоловый голубой — 0,04 г;
агар — 8,0–18,0 г[1)];
вода — 1000 см^3.

В.2.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную основу в воде доведением до кипения. Если необходимо, регулируют pH так, чтобы он составлял 8,6 ± 0,2 при 25 °С. Среду не автоклавируют.

В.2.3 Приготовление чашек с агаром

Разливают в чашки Петри по 15 — 20 см^3 свежеприготовленной среды, охлажденной приблизительно до 50 °С, и оставляют для застывания.

Непосредственно перед использованием тщательно подсушивают поверхность агаровой среды в чашках Петри (предпочтительнее после снятия крышек и переворачивания чашек).

В.2.4 Контроль среды

Для количественной оценки эффективности роста для каждой партии TCBS агара используют солевой питательный агар (SNA) как сравнительную среду и следующие штаммы:

- V. parahaemolyticus: NCTC 10885;
- V. furnissii: NCTC 11218;
- Escherichia coli: ATCC 25922, 8739 или 11775.

Эффективность роста рассчитывают по формуле

$$(N_{TCBS} / N_{SNA}) \cdot 100,$$

где N — количество выросших колоний.

Эффективность роста должна составлять как минимум 50 % для каждых видов Vibrio (организмы положительного контроля) и менее 1 % для E. coli (организмы отрицательного контроля). Колонии V. parahaemolyticus: NCTC 10885 должны быть зелеными (сахарозоотрицательными), а колонии V. furnissii: NCTC 11218 должны быть желтыми (сахарозоположительными).

[1)] В зависимости от желирующих свойств агара.

B.3 Солевой питательный агар (SNA)

B.3.1 Состав:
мясной экстракт — 5,0 г;
пептон — 3,0 г;
натрия хлорид — 10,0 г;
агар — 8,0–18,0 г[1)];
вода — 1000 см^3.

B.3.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную основу среды в воде, нагревая, при необходимости. Регулируют pH так, чтобы после стерилизации он составлял 7,2 ± 0,2 при 25 °C.

Разливают среду в емкости подходящей вместимости. Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при 121 °C.

B.3.3 Приготовление чашек с солевым питательным агаром

Разливают в стерильные чашки Петри по 15–20 см^3 среды, охлажденной приблизительно до 50 °C. Оставляют для застывания.

Непосредственно перед применением тщательно подсушивают поверхность агара в чашках Петри (предпочтительнее после снятия крышек и переворачивания чашек).

B.3.4 Приготовление пробирок со скошенным агаром

Разливают примерно по 10 см^3 среды, охлажденной приблизительно до 50 °C, в пробирки подходящей вместимости. Оставляют до застывания в наклонном положении.

B.4 Реактив для определения оксидазы

B.4.1 Состав:
N, N, N', N' — Тетраметил-пара-фенилендиамин дигидрохлорид — 1,0 г
Вода — 100 см^3.

B.4.2 Приготовление

Растворяют компоненты в холодной воде непосредственно перед использованием.

B.5 Солевой трехсахарный железистый агар (TSI)

B.5.1 Состав:
пептон — 20,0 г;
мясной экстракт — 3,0 г;
дрожжевой экстракт — 3,0 г;
натрия хлорид — 10,0 г;
лактоза — 10,0 г;
сахароза — 10,0 г;
глюкоза — 1,0 г;
железо (iii) цитрат, 0,3 г;
феноловый красный — 0,024 г;
агар — 8,0–18,0 г[1)];
вода — 1000 см^3.

B.5.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную основу среды в воде, нагревая при необходимости. Если необходимо, регулируют pH так, чтобы после стерилизации он был 7,4 ± 0,2 при 25 °C.

Разливают среду по 10 см^3 в пробирки подходящей вместимости. Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при 121 °C.

Оставляют для застывания в наклонном положении так, чтобы получить столбик высотой 2,5 см.

Если среда используется более чем через восемь дней после приготовления, ее регенерируют расплавлением в водяной бане при кипении или текучим паром в течение 10 мин. Оставляют для застывания, как указано выше.

B.6 Солевая среда для определения орнитин декарбоксилазы (ODC)

B.6.1 Состав:
L-Орнитин моногидрохлорид — 5,0 г;
дрожжевой экстракт — 3,0 г;
глюкоза — 1,0 г;
бромкрезоловый пурпурный — 0,015 г;
натрия хлорид — 10,0 г;
вода — 1000 см^3.

[1)] В зависимости от желирующих свойств агара.

B.6.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, нагревая при необходимости. Если необходимо, регулируют pH так, чтобы он составлял 6,8 ± 0,2 при 25 °C.

Разливают среду по 2 — 5 $см^3$ в узкие пробирки. Стерилизуют 15 мин в автоклаве при 121 °C.

B.7 Солевая среда для определения лизин декарбоксилазы (LDC)

B.7.1 Состав:

L-Лизин моногидрохлорид — 5,0 г;
дрожжевой экстракт — 3,0 г;
глюкоза — 1,0 г;
бромкрезоловый пурпурный — 0,015 г;
хлорид натрия — 10,0 г;
вода — 1000 $см^3$.

B.7.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, нагревая при необходимости. Если необходимо, регулируют pH, так, чтобы он составлял 6,8 ± 0,2 при 25 °C.

Разливают среду по 2 — 5 $см^3$ в узкие пробирки. Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при 121 °C.

B.8 Солевая среда для определения аргинин дегидроксилазы (ADH)

B.8.1 Состав:

аргинин моногидрохлорид — 5,0 г;
дрожжевой экстракт — 3,0 г;
глюкоза — 1,0 г;
бромкрезоловый пурпурный — 0,015 г;
натрия хлорид — 10,0 г;
вода — 1 000 $см^3$.

B.8.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, нагревая при необходимости. Если необходимо, регулируют pH так, чтобы он составлял 6,8 ± 0,2 при 25 °C.

Разливают среду по 2 — 5 $см^3$ в узкие пробирки. Стерилизуют 15 мин в автоклаве при 121 °C.

B.9 Реактивы для определения β-галактозидазы

B.9.1 OPNG раствор

B.9.1.1 Состав:
2-орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (OPNG) — 0,08 г;
вода — 15 $см^3$.

B.9.1.2 Приготовление

Растворяют OPNG в воде приблизительно при 50 °C. Охлаждают раствор.

B.9.2. Буферный раствор

B.9.2.1 Состав:
натрия дигидрофосфат (NaH_2PO_4) — 6,9 г;
натрия гидроксид (NaOH) (0,1 моль/$дм^3$ раствор) — приблизительно 3 $см^3$;
вода до конечного объема — 50 $см^3$.

B.9.2.2 Приготовление

Растворяют дигидрофосфат натрия в мерной колбе приблизительно в 45 $см^3$ воды.

Регулируют pH так, чтобы он составлял 7,0 ± 0,2 при 25 °C с помощью раствора гидроксида натрия. Доводят объем водой до 50 $см^3$.

B.9.3 Готовый реактив

B.9.3.1 Состав:
буферный раствор (B.9.2) — 5 $см^3$;
OPNG раствор (B.9.1) –15 $см^3$.

B.9.3.2 Приготовление

Добавляют буферный раствор к раствору OPNG. Хранят при температуре от 0 °C до 5 °C.

B.10 Солевая среда для определения индола

B.10.1 Триптофановая солевая среда

B.10.1.1 Состав:
энзиматически переваренный казеин — 10,0 г;
DL-Триптофан — 1,0 г;
натрия хлорид — 10,0 г;
вода — 1000 $см^3$.

B.10.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, нагревая при необходимости, и фильтруют. Если необходимо, регулируют pH так, чтобы после стерилизации он составлял 7,0 ± 0,2 при 25 °C.

Разливают среду по 5 $см^3$ в пробирки подходящей вместимости. Стерилизуют 15 мин в автоклаве при 121 °С.

В.10.2 Реактив Ковача

В.10.2.1 Состав:

4-диметиламинобензальдегид — 5,0 г;

соляная кислота, плотностью ρ от 1,18 г/$см^3$ до 1,19 г/ $см^3$ — 25 $см^3$;

2-метилбутан-2-ол — 75 $см^3$.

В.10.2.2 Приготовление

Смешивают компоненты.

В.11 Солевые пептонные воды

В.11.1 Состав:

пептон — 10,0 г;

натрия хлорид — 0, 20, 60, 80 или 100 г;

вода — 1000 $см^3$.

В.11.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, нагревая при необходимости. Если необходимо, регулируют pH так, чтобы после стерилизации он составлял 7,5 ± 0,2 при 25 °С.

Разливают среду по пробиркам подходящей вместимости. Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при 121 °С.

В.12 Раствор хлорида натрия

В.12.1 Состав:

натрия хлорид — 10,0 г;

вода — 1000 $см^3$.

В.12.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, нагревая при необходимости. Если необходимо, регулируют pH так, чтобы после стерилизации он составлял 7,5 ± 0,2 при 25 °С.

Разливают раствор по пробиркам подходящей вместимости. Стерилизуют 15 минут в автоклаве при 121 °С.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 6887-1 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений	—	*
ISO 6887-2 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила подготовки мяса и мясных продуктов	—	*
ISO 6887-3 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов	—	*
ISO 6887-4 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для приготовления продуктов, кроме молока и молочных продуктов, мяса и мясных продуктов и рыбы и рыбопродуктов	—	*
ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям	IDT	ГОСТ ISO 7218 — 2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям
ISO 8261 Молоко и молочные продукты. Общие правила приготовления проб для анализа, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований	—	*

* Соответствующий межгосударственный 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 использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] 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

[2] ISO/TS 11133-2 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

УДК 543.9:006.354 МКС 07.100.30
65.120
67.050 IDT

Ключевые слова: микробиология, пищевые продукты, корма для животных, горизонтальный метод обнаружения, Vibrio parahaemoliticus, Vibrio cholerae, инкубирование посевов, чашки Петри, колонии, питательные среды, подтверждение

Подписано в печать 02.10.2014. Формат 60х84⅛.
Усл. печ. л. 2,79. Тираж 54 экз. Зак. 4542

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

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

gost.e-ecolog.ru