ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 10272-1— 2010

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Часть 1

Метод обнаружения Campylobacter spp.

ISO 10272-1:2006
Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 1: Detection method
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

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 изменения 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 собственного аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 ноября 2010 г. № 546-ст

4 Настоящий стандарт является идентичным международному стандарту ИСО 10272-1:2006 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий Campylobacter spp. Часть 1. Метод обнаружения» (ISO 10272-1:2006 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 1: Detection method»).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2004 (пункт 3.5).

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам) 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 издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2012

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 1
4 Сущность метода 2
5 Питательные среды и реактивы 2
6 Оборудование и стеклянная химическая посуда 3
7 Отбор проб 3
8 Приготовление испытуемой пробы 4
9 Методы проведения испытаний (см. приложение А) 4
10 Обработка результатов 6
Приложение А (обязательное) Диаграмма методики работы 7
Приложение В (обязательное) Состав и приготовление питательных сред и реактивов 8
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам) 12
Библиография 13

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Часть 1

Метод обнаружения Campylobacter spp.

Microbiology of food and animal feeding stuffs. Part 1. Method for detection of Campylobacter spp.

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения Campylobacter spp. и распространяется на продукцию, предназначенную для потребления человеком или кормления животных. Настоящий стандарт может быть использован при оценке окружающей среды при производстве пищевой продукции и обращении с ней.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ИСО 6887 (все части) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление испытуемых проб, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований

ИСО 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие правила микробиологических исследований

ИСО 8261 Молоко и молочные продукты. Общие правила приготовления испытуемых проб, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований

ИСО/ТУ 11133-1 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 1. Общие правила по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории

ИСО/ТУ 11133-2 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие положения по приготовлению и производству питательных сред. Часть 2. Практические руководящие положения по определению эффективности питательных сред

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **Campylobacter** (Campylobacter): Микроорганизмы, образующие характерные колонии на твердой селективной среде, когда их инкубируют микроаэробным способом при температуре 41,5 °С, но не при 25 °С, которые обладают характерной подвижностью, биохимическими свойствами и способностью к росту, описанными в тех случаях, когда испытания проводят в соответствии с настоящим стандартом.

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

Издание официальное

3.2 **обнаружение Campylobacter** (detection of Campylobacter): Определение присутствия или отсутствия рассматриваемых микроорганизмов в определенном количестве продукта при условии проведения испытания в соответствии с настоящим стандартом.

4 Сущность метода

4.1 Общие положения

Для обнаружения Campylobacter выполняют этапы работ в соответствии с приложением А.

4.2 Обогащение в селективной жидкой среде

Пробой инокулируют жидкую обогатительную среду (бульон Болтона) и гомогенизируют.

Инкубируют в аэробной атмосфере при температуре 37 °С в течение 4—6 ч и затем при температуре 41,5 °С в течение (44 ± 4) ч.

4.3 Изоляция и отбор для подтверждения

Из культур, полученных по 4.2, инокулируют две твердые селективные среды:

- модифицированный агар с углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (агар mCCD);
- любую другую твердую селективную среду, основанную на принципе, отличном от принципа агара mCCD.

Далее их инкубируют при температуре 41,5 °С в аэробной атмосфере и проверяют после (44 ± 4) ч с целью обнаружения присутствия колоний, которые по своим характеристикам предположительно являются Campylobacter.

4.4 Подтверждение

Колонии, предположительно являющиеся Campylobacter, пересевают на неселективный колумбийский кровяной агар и затем подтверждают при исследовании под микроскопом и надлежащих биохимических испытаниях и испытаниях на рост.

Вид Campylobacter идентифицируют путем специфических биохимических испытаний и испытаний на чувствительность к антибиотикам.

5 Питательные среды и реактивы

5.1 Общие положения

Качество подготовки, изготовления и оценки эффективности питательных сред для выращивания Campylobacter по ИСО 7218, ИСО/ТУ 11133-1 и ИСО/ТУ 11133-2.

Примечание — Ввиду наличия большого количества питательных сред и реактивов их составы и процедуры приготовления дополнительно 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 (агар mCCD)

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 Бруцелла

См. В.4.

5.4.3 Реактив для обнаружения оксидазы

См. В.5.

5.4.4 Раствор пероксида водорода, 3 % (по объему).

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 (30 мкг) и цефалотином (30 мкг).

5.4.8 Диски с индоксилацетатом

См. В.8.

6 Оборудование и стеклянная химическая посуда

Используют обычное микробиологическое лабораторное оборудование по ИСО 7218.

6.1 Оборудование для сухой стерилизации (сушильный шкаф) или влажной стерилизации (автоклав) по 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 (41,5 ± 1) °С.

6.4 Водяные бани, работающие в диапазоне температур (25 ± 1) °С и (37 ± 1) °С, или термостаты, работающие в диапазоне температур (25 ± 1) °С и (37 ± 1) °С.

6.5 Водяная баня, работающая в диапазоне температур 47 °С — 50 °С.

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

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

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

6.9 Градуированные пипетки с полным сливом, с широким отверстием, номинальной вместимостью 1 и 10 $см^3$, градуированные с делениями 0,1 $см^3$, и пастеровские пипетки.

6.10 Резиновые соски или любая другая безопасная система, которую можно адаптировать к градуированным пипеткам.

6.11 Стерильные петли, платиново-иридиевые, никелево-хромовые или пластиковые, диаметром приблизительно 3 мм, и проволоки из того же материала или стеклянная или пластиковая палочка.

Никелево-хромовая петля не пригодна для использования в испытании на оксидазу (см. 9.4.6).

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

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

6.14 Надлежащее оборудование для достижения аэробной атмосферы с содержанием кислорода (5 ± 2) %, диоксида углерода (10 ± 3) %, альтернативного водорода ≤ 10 %, с соблюдением баланса азота. Используют подходящие герметичные контейнеры, чтобы удерживать чашки Петри и/или колбы или бутылки вместимостью 350 $см^3$, используемые для обогатительного бульона.

Примечания

1 Необходимая аэробная атмосфера достигается при использовании имеющихся в продаже газогенераторных комплектов; следует в точности соблюдать производственные инструкции, особенно те из них, которые касаются объема сосуда и вместимости газогенераторного комплекта. В качестве альтернативы используют заполнение сосуда надлежащей газовой смесью перед инкубацией.

2 В качестве альтернативы инкубации в аэробной атмосфере обогатительный бульон можно инкубировать в бутылках с винтовыми крышками или колбах, заполнив их обогатительным бульоном, оставляя свободное пространство менее 2 см и тщательно закупоривая крышками.

7 Отбор проб

В лабораторию направляют представительную пробу. Проба не должна быть повреждена или изменена в процессе транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Отбор проб проводят в соответствии с конкретным стандартом на данную продукцию, в случае его отсутствия рекомендуется достижение соглашения заинтересованных сторон по отбору проб конкретного продукта.

Принимая во внимание, что Campylobacter spp. весьма чувствительны к замораживанию, испытуемые пробы не замораживают и хранят при температуре (3 ± 2) °С. Их анализируют в кратчайшие сроки. Также принимают меры по предотвращению высыхания проб.

8 Приготовление испытуемой пробы

Испытуемую пробу приготовляют в соответствии с конкретным стандартом на определенный вид продукции. Если не существует конкретного стандарта, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли соглашения по данному вопросу.

9 Методы проведения испытаний (см. приложение А)

9.1 Пробы, исходная суспензия и разбавления

Для приготовления исходной суспензии количество *x* порции пробы (масса или объем) вводят в девятикратный объем обогатительной среды — бульон Болтона (5.2), с тем чтобы получить соотношение проба/обогатительная среда 1:10 (масса/объем или объем/объем). Гомогенизируют.

9.2 Обогащение

Исходную суспензию (9.1) инкубируют в аэробной атмосфере (6.14) при температуре 37 °С в течение 4—6 ч, затем при температуре 41,5 °С в течение (44 ± 4) ч.

9.3 Изоляция

9.3.1 Используя культуру, полученную в обогатительной среде (9.2), инокулируют стерильной петлей (6.11) поверхность первой селективной изолирующей среды, агара mCCD (5.3).

Аналогичным образом поступают со второй выбранной селективной изолирующей средой для Campylobacter.

Примечание — Предпочтительно выбрать вторую изолирующую среду, основанную на принципах, отличных от агара mCCD. Примерами изолирующих сред, которые можно использовать, являются агар Skirrow, агар Karmali и агар Preston (см. библиографию).

9.3.2 Слои (9.3.1) инкубируют при температуре 41,5 °С в аэробной атмосфере (6.14).

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

Типичные колонии на агаре mCCD имеют сероватый цвет, часто с металлическим блеском, они плоские и влажные и имеют тенденцию к разрастанию. Разрастание колоний менее выражено на более сухих поверхностях агара. Возможно образование других форм колоний.

9.4 Подтверждение вида Campylobacter

9.4.1 Общие положения

Поскольку рассматриваемые бактерии быстро разрушаются на воздухе, необходимо незамедлительно следовать процедурам, описанным в 9.4.2 — 9.4.6.

9.4.2 Отбор колоний для подтверждения

9.4.2.1 Для подтверждения с каждого слоя каждой селективной среды (9.3.1) отбирают по меньшей мере одну колонию, рассматриваемую в качестве типичной или подозрительной колонии Campylobacter, и еще четыре колонии, если первая дала отрицательный результат.

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

9.4.3 Исследование морфологии и подвижности

9.4.3.1 Одну колонию со слоя колумбийского кровяного агара (9.4.2.2) суспендируют в 1 $см^3$ бульона Бруцелла (5.4.2) и исследуют морфологию и подвижность при помощи микроскопа (6.13).

9.4.3.2 Для дальнейшего исследования сохраняют все культуры (9.4.2.2), в которых обнаружены изогнутые палочки со спиральной «штопорообразной» подвижностью (9.4.3.1).

9.4.4 Исследование аэробного роста при температуре 25 °С

Используя колонии, изолированные по 9.4.2.2, инокулируют при помощи петли (6.11) поверхность слоя колумбийского кровяного агара (5.4.1).

Слой инкубируют при температуре 25 °С в аэробной атмосфере (6.14) в течение (44 ± 4) ч.

Исследуют слой с целью выявления видимого роста колоний Campylobacter.

9.4.5 Исследование аэробного роста при температуре 41,5 °С

Используя колонии, изолированные по 9.4.2.2, инокулируют при помощи петли (6.11) поверхность слоя колумбийского кровяного агара (5.4.1).

Слой инкубируют при температуре 41,5 °С в аэробной атмосфере (6.14) в течение (44 ± 4) ч.

Исследуют слой с целью выявления видимого роста колоний Campylobacter.

9.4.6 Обнаружение оксидазы

Используя платиново-иридиевую петлю или стеклянную палочку (6.11), отбирают порцию четко изолированной колонии из каждой отдельной чашки (9.4.2.2) и наносят на фильтровальную бумагу, смоченную реактивом для обнаружения оксидазы (5.4.3). Появление лилового, сиреневого 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.

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

9.4.7 Интерпретацию Campylobacter spp. проводят по результатам таблицы 1.

Таблица 1 — Характеристики Campylobacter spp.

Наименование показателя	Характеристика
Морфология (9.4.3)	Малые искривленные бациллы
Подвижность (9.4.3)	Характерная
Микроаэробный рост при температуре 25 °С (9.4.4)	—
Аэробный рост при температуре 41,5 °С (9.4.5)	—
Оксидаза (9.4.6)	+

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

9.5 Идентификация вида Campylobacter (альтернативная процедура)

9.5.1 Общие положения

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

9.5.2 Определение каталазы

Для каждой колонии, отобранной в соответствии с 9.4.2.2, помещают петлю культуры в каплю раствора пероксида водорода (5.4.4) на чистом предметном стекле.

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

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

9.5.3 Определение чувствительности к налидиксовой кислоте и цефалотину

Для каждой колонии, отобранной в соответствии с 9.4.2.2, используют петлю (6.11) с целью приготовления суспензии в бульоне Бруцелла (5.4.2), плотностью 0,5 по шкале МакФарланда.

Суспензию разбавляют в отношении 1:10 тем же бульоном.

Заливают суспензией поверхность слоя с 5 %-ным кровяным агаром Мюллера-Хинтона (5.4.6).

Выдерживают в течение 5 мин, сливают избыток суспензии. Чашки высушивают в сушильном шкафу (6.2) при 37 °С в течение 10 мин.

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

Чашки инкубируют крышками вниз при температуре 37 °С в течение (22 ± 2) ч в микроаэробной атмосфере (6.14).

---

* Национальная коллекция типовых культур (National collection of type cultures, NCTC).

Результаты бактериального роста интерпретируют следующим образом:

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

9.5.4 Определение гидролиза гиппурата

Для каждой колонии, отобранной в соответствии с 9.4.2.2, 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 на то, 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 температуре 37 °С.

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

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

Темно-фиолетовый цвет свидетельствует о положительной реакции.

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

Результаты подтверждают, используя положительный и отрицательный контроль. Примерами подходящих контрольных штаммов являются Campylobacter jejuni NCTC* 11351 (положительный контроль), Campylobacter coli NCTC* 11366 (отрицательный контроль).

9.5.5 Определение гидролиза индоксилацетата

Помещают колонию, отобранную в соответствии с 9.4.2.2, 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 гидролиз отсутствовал.

Результаты подтверждают, используя положительный и отрицательный контроль. Примерами подходящих контрольных штаммов являются Campylobacter jejuni NCTC* 11351 (положительный контроль), Campylobacter lari NCTC* 11352 (отрицательный контроль).

9.5.6 Интерпретация

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

Таблица 2 — Характеристики видов Campylobacter

Характеристика	C. jejuni	C. coli	C. lari	C. upsaliensis
Каталаза (9.5.2)	+	+	+	— или малое количество
Налидиксовая кислота (9.5.3)	S[a]	S[a]	R/S[b]	S
Цефалотин (9.5.3)	R	R	R	S
Гидролиз гиппурата (9.5.4)	+	—	—	—
Индоксилацетат (9.5.5)	+	+	—	+

«+» — положительная реакция; «—» — отрицательная реакция;
S — чувствительный рост; R — устойчивый рост.

[a] Было подтверждено увеличение устойчивости к налидиксовой кислоте штаммов C. jejuni и C. coli.
[b] Были отмечены одновременно чувствительные и устойчивые штаммы C. lari.

10 Обработка результатов

В соответствии с интерпретацией результатов указывают наличие или отсутствие Campylobacter в порции пробы *x* г или *x* см^3 продукта по ИСО 7218.

* Национальная коллекция типовых культур (National collection of type cultures, NCTC).

Приложение А
(обязательное)

Диаграмма методики работы

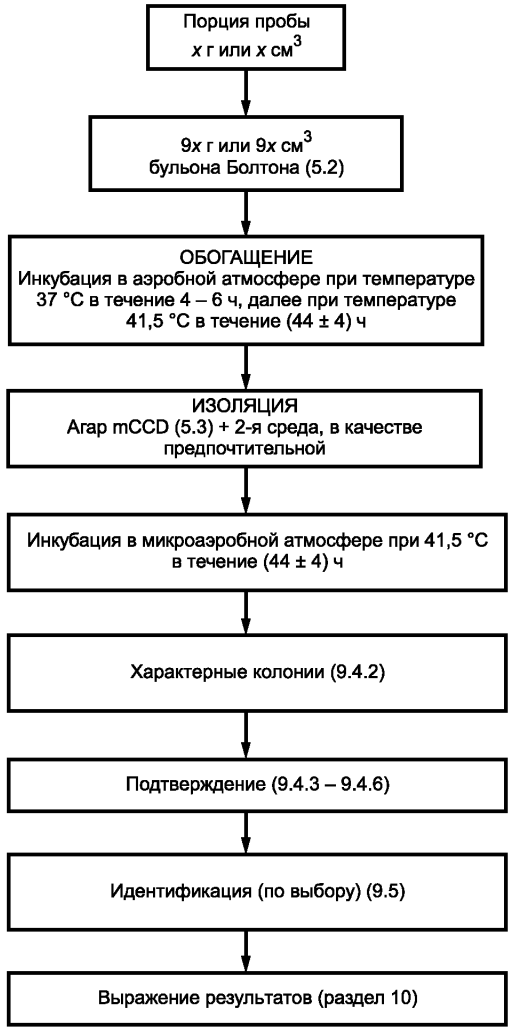


Рисунок А.1

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 (раствор в 0,1 %-ном растворе натрия гидроксида) — 0,01 г;
вода — 1000 $см^3$.

В.1.1.2 Приготовление

Базовые компоненты по В.1.1.1 или готовую обезвоженную среду растворяют в 1000 $см^3$ воды при слабом нагреве.

Корректируют pH так, чтобы после стерилизации его значение для готовой среды составляло (7,4 ± 0,2) при температуре 25 °С.

Среду разливают в колбы вместимостью 100—200 $см^3$. Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 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 Антибиотический раствор

В.1.3.1 Состав:

цефоперазон — 0,02 г;
ванкомицин — 0,02 г;
триметоприма лактат — 0,02 г;
амфотерицин В — 0,01 г;
этанол/стерильная дистиллированная вода 50:50 (по объему) — 5,0 $см^3$.

В.1.3.2 Приготовление

Компоненты растворяют в смеси этанола и стерильной дистиллированной воды в соотношении 50:50.

В.1.4 Полная среда

В.1.4.1 Состав:

базовая среда (В.1.1) — 1000 $см^3$;
стерильная лизированная дефибринированная кровь лошади (В.1.2) — 50 $см^3$;
антибиотический раствор (В.1.3) — 5 $см^3$.

В.1.4.2 Приготовление

К базовой среде при температуре от 47 °С до 50 °С в стерильных условиях добавляют кровь, затем антибиотический раствор и перемешивают. Соблюдая стерильность, среду разливают в пробирки или колбы (см. 9.1.2), чтобы приготовить объем сред, необходимый для испытания. Если обогатительную среду приготовляют заранее, ее надо хранить не более 4 ч при комнатной температуре или в темном месте при (3 ± 2) °С не более семи дней.

В.1.5 Эксплуатационное испытание

Эксплуатационные характеристики бульона Болтона необходимо испытывать в соответствии с методами и критериями, описанными в ИСО 11133-2. Примерами подходящих контрольных штаммов являются Campylobacter jejuni NCTC 11351 или ATCC[1)] 33291 со следующими критериями: > 10 колоний на модифицированном агаре с углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (mCCD) после инкубации в микроаэробных условиях при 41,5 °С в течение (44 ± 4) ч.

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

В.2.1 Базовая среда

В.2.1.1 Состав:

мясной экстракт — 10,0 г;

[1)] Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC).

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 сульфат (II) — 0,25 г;
натрия пируват — 0,25 г;
агар — 8,0 —18,0 г[1)];
вода — 1000 см^3.

B.2.1.2 Приготовление

Компоненты для базовой среды или обезвоженную базовую среду растворяют в 1000 см^3 воды и постепенно доводят до кипения. При необходимости, корректируют pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,4 ± 0,2) при температуре 25 °С.

Базовую среду разливают в колбы вместимостью 100—200 см^3. Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 121 °С в течение 15 мин.

B.2.2 Антибиотический раствор

B.2.2.1 Состав:

цефаперазон — 0,032 г;
амфотерицин В — 0,01 г;
вода — 5 см^3.

B.2.2.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде. Стерилизуют путем фильтрации.

B.2.3 Полная среда

B.2.3.1 Состав:

базовая среда (B.2.1) — 1000 см^3;
антибиотический раствор (B.2.2) — 5 см^3.

B.2.3.2 Приготовление

Антибиотический раствор добавляют к базовой среде, охлажденной до температуры 47 °С — 50 °С, затем тщательно перемешивают. Разливают по 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 в темноте при температуре (3 ± 2) °С не более семи дней.

B.2.4 Эксплуатационное испытание

Определение селективности или производительности по ИСО 11133-1. Информация о эксплуатационных критериях — в ИСО 11133-2, таблица B.5.

B.3 Колумбийский кровяной агар

B.3.1 Базовая среда

B.3.1.1 Состав:

продукт ферментативного переваривания животных тканей — 23,0 г;
крахмал — 1,0 г;
натрия хлорид — 5,0 г;
агар — 8,0 — 18,0 г[1)];
вода — 1000 см^3.

B.3.1.2 Приготовление

Базовые компоненты или полную обезвоженную базовую среду растворяют в воде путем нагрева. При необходимости корректируют pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,3 ± 0,2) при 25 °С. Базовую среду распределяют в колбы подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве (6.1), установленном на 121 °С, в течение 15 мин.

B.3.2 Стерильная дефибринированная баранья кровь

B.3.3 Полная среда

B.3.3.1 Состав:

базовая среда (B.3.1) — 1000 см^3;
антибиотический раствор (B.3.2) — 5,0 см^3.

B.3.3.2 Приготовление

Кровь в стерильных условиях добавляют 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

[1)] В зависимости от прочности геля агара.

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 семи дней при температуре (3 ± 2) °С.

В.4 Бульон Бруцелла

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 — 1000 $см^3$.

В.4.2 Приготовление

Компоненты для базовой среды или готовую обезвоженную среду растворяют в воде, постепенно нагревая. При необходимости корректируют pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,3 ± 0,2) при температуре 25 °С. Базовую среду объемом 10 $см^3$ распределяют в колбы подходящей емкости. Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 121 °С в течение 15 мин.

В.5 Реагент для обнаружения оксидазы

В.5.1 Состав:

N,N,N',N'-тетраметил-1,4-фенилендиамина дигидрохлорид — 1,0 г;
вода — 100,0 $см^3$.

В.5.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде непосредственно перед использованием.

В.6 Реагенты для обнаружения гидролиза гиппурата

В.6.1 Раствор гиппурата натрия

В.6.1.1 Состав:

натрия гиппурат — 10,0 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 — 1000,0 $см^3$.

В.6.1.2 Приготовление

Гиппурат натрия растворяют в растворе PBS. Стерилизуют путем фильтрации. Соблюдая стерильность, реагент объемом 0,4 $см^3$ распределяют в малые колбы надлежащей вместимостью (6.7). Хранят при температуре 20 °С.

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

В.6.2.1 Состав:

нингидрин — 1,75 г;
ацетон — 25 $см^3$;
бутанол — 25 $см^3$.

В.6.2.2 Приготовление

Нингидрин растворяют в смеси ацетон/бутанол. Раствор хранят в холодильнике в темноте не более 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 — 18,0 г[1)];
вода — 1000 $см^3$.

В.7.1.2 Приготовление

Компоненты для среды или готовую обезвоженную базовую среду растворяют в 1000 $см^3$ воды и постепенно доводят до кипения. При необходимости корректируют pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял

[1)] В зависимости от прочности геля агара.

(7,3 ± 0,2) при температуре 25 °С. Базовую среду разливают в колбы вместимостью 100—200 см^3. Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 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) — 1000,0 см^3;

стерильная дефибринированная баранья кровь (В.7.2) — 50,0 см^3.

В.7.3.2 Приготовление

Кровь в стерильных условиях добавляют к базовой среде, охлажденной до температуры 47 °С — 50 °С, постоянно перемешивая. 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 семи дней при температуре (3 ± 2) °С.

В.8 Диски с индоксилацетатом

В.8.1 Состав:

индоксилацетат — 0,1 г;

ацетон — 1,0 см^3.

В.8.2 Приготовление

Индоксилацетат растворяют в ацетоне. Наносят от 25 до 50 мкл данного раствора на чистые бумажные диски (диаметр от 0,6 до 1,2 см). После высушивания при комнатной температуре диски хранят при температуре 4 °С в темных пробирках или бутылках в присутствии силикагеля.

Приложение ДА
(справочное)

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

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 6887	—	*
ИСО 7218:2007	IDT	ГОСТ Р ИСО 7218—2008 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям»
ИСО 8261:2001	—	*
ИСО/ТУ 11133-1:2000	IDT	ГОСТ Р ИСО 11133-1—2008 «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 Р ИСО 11133-2—2008 «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 следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] BAYLIS, C.L. et al. Comparison of three enrichment media for the isolation of Campylobacter spp. from foods. J. Appl. Microbiol. 2000, 89, pp. 884—891

[2] BOLTON, F.J. and ROBERTSON, L. A selective medium for isolating Campylobacter jejuni/coli. J. Clin. Pathol. 1982, 35, pp. 462—467

[3] BOLTON, F.J. et al. A blood-free selective medium for the isolation of Campylobacter jejuni from faeces. J. Clin. Microbiol. 1984, 19, pp. 169—171

[4] BOLTON, F.J. et al. 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

[5] CORRY, J.E.L. et al. (eds). Handbook of culture media for food microbiology. Progress in Industrial Microbiology. Vol. 37. Elsevier, Amsterdam, 2003

[6] HUNT, J.M. et al. Campylobacter. In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, AOAC, Arlington Va, USA, 1998

[7] HUTCHINSON, D.N. and BOLTON, F.J. Improved blood-free selective medium for the isolation of Campylobacter jejuni from faecal specimen. J. Clin. Pathol. 1984, 37, pp. 956—957

[8] KARMALI, M.A. et al. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of Campylobacter organisms from faeces. J. Clin. Microbiol. 1986, 23, pp. 456—459

[9] SKIRROW, M.B. Campylobacter enteritis: a new disease. Brit. Med. J. 1977, 2, pp. 9—11

УДК 663/664.777:006.354 ОКС 07.100.30
67.040 Н09

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

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *А.В. Бестужевой*

Сдано в набор 28.12.2011. Подписано в печать 18.01.2012. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,65. Тираж 201 экз. Зак. 58.

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