ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53913— 2010 (ИСО 16654:2001)

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальный метод обнаружения Escherichia coli O157

ISO 16654:2001
Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157
(MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе аутентичного перевода на русский язык международного 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 10 ноября 2010 г. № 365-ст

4 Настоящий национальный стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 16654:2001 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения Escherichia coli O157» (ISO 16654:2001 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157») путем изменения содержания отдельных структурных элементов, которые выделены курсивом или заключены в рамку.

Сведения о соответствии ссылочных национальных стандартов международным стандартам, использованным в качестве ссылочных в указанном международном стандарте, 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, 2011

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
5 Питательные среды, реактивы и антисыворотки 2
6 Оборудование и лабораторная посуда 5
7 Отбор проб 6
8 Подготовка проб 6
9 Методика проведения испытания по схеме, приведенной в приложении А 6
10 Обеспечение качества испытания 8
11 Выражение результатов 8
12 Протокол испытания 8
Приложение А (обязательное) Схема методики проведения испытания 9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных национальных и межгосударственных стандартов международным стандартам, использованным в качестве ссылочных в примененном международном стандарте 10

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальный метод обнаружения Escherichia coli O157

Microbiology of food and animal feeding stuffs.
Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, корма для животных и устанавливает метод обнаружения бактерий Escherichia coli O157 с обязательным использованием четырех последовательных стадий.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Бактерия Escherichia coli O157 может вызывать тяжелую болезнь, опасную для жизни, и имеет низкую дозу инфекционности. Зарегистрировано приобретенное внутрилабораторное заражение.

В целях защиты здоровья персонала лаборатории важно, чтобы этот метод обнаружения выполняли только квалифицированные сотрудники, используя общепринятую лабораторную практику и предпочтительно работая в защищенном производственном помещении. В отношении данного организма необходимо придерживаться требований соответствующих национальных регламентов о здоровье и безопасности на рабочих местах.

Следует соблюдать меры безопасности при утилизации всех инфекционных материалов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 7218—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ Р 51426—99 (ИСО 6887—83) Микробиология. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

ГОСТ Р 51448—99 (ИСО 3100-2—88) Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований

ГОСТ Р 53430—2009 Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 26668—85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26669—85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим

Издание официальное

ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по *ГОСТ Р ИСО 7218*, а также следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **escherichia coli O157 (E. coli O157):** Микроорганизмы, которые образуют типичные колонии на поверхности засеваемой в чашке среды, а также индол, и специфическим образом агглютинируют с антисывороткой к антигену O157.

Примечания:

1 Сорбит-положительные штаммы E. coli O157 не обнаружены в среде CT-SMAC (5.2).

2 Обнаружены некоторые индол-отрицательные мутации.

4 *Сущность метода*

Обнаружение Escherichia coli O157 связано с обязательным использованием четырех последовательных стадий в соответствии с приложением А:

- обогащение пробы для анализа, гомогенизированной в модифицированном триптон-соевом бульоне, содержащем новобиоцин (mTSB + N), с инкубацией при температуре (41,5 ± 1) °С в течение 6 ч, а затем еще в течение 12—18 ч;
- сепарация и концентрация микроорганизмов с помощью иммуномагнитных частиц, связанных с антителами к бактерии E. coli O157;
- выделение путем пересева иммуномагнитных частиц с налипшими бактериями на агаровую среду Мак-Конки, в которую добавляют сорбит и суплемент CT (цефиксим и теллурит калия) (CT-SMAC), и на выбранную заказчиком вторую селективную агаровую среду для выделения;
- подтверждение идентификации сорбит-негативных колоний на среде CT-SMAC и колоний типичных для E. coli O157 на второй агаровой среде для выделения в результате образования индола и агглютинации с антисывороткой к E. coli O157.

Примечание — Определение других характеристик положительных штаммов, например, с помощью патогенных маркеров, возможно после их передачи в соответствующую референтную лабораторию.

5 Питательные среды, реактивы и антисыворотки

Общие правила микробиологических исследований — по ГОСТ Р ИСО 7218.

5.1 Обогатительная среда (модифицированный триптон-соевый бульон с новобиоцином (mTSB + N)

Состав:

Ферментативный перевар казеина . . . . . 17,0 г.
Ферментативный перевар сои . . . . . 3,0 г.
D(+)-глюкоза . . . . . 2,5 г.
Желчные соли No. 3 . . . . . 1,5 г.
Хлорид натрия . . . . . 5,0 г.
Моногидрофосфат калия (K_2HPO_4) . . . . . 4,0 г.
Дистиллированная вода . . . . . 1 000 $см^3$.

5.1.1 Приготовление среды

Растворяют компоненты или готовую дегидратированную питательную среду в воде, при необходимости подогревают. Устанавливают уровень pH, используя pH-метр (см. 6.6), если необходимо, так, чтобы после стерилизации он соответствовал pH (7,4 ± 0,2) при температуре 25 °С.

Разливают среду в соответствующих количествах в колбы или склянки (6.7).

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве (см. 6.1) при температуре 121 °С.

5.1.1.1 Раствор новобиоцина

Состав:

Новобиоцин . . . . . 0,45 г.
Дистиллированная вода . . . . . 100 $см^3$

Приготовление раствора:

Растворяют новобиоцин в воде и стерилизуют фильтрованием через микропористую мембрану. Готовят *раствор перед определением.*

5.1.1.2 Приготовление готовой среды

Непосредственно перед применением *в среду (см. 5.1.1)* добавляют 1 см^3 или 4 см^3 раствора новобиоцина (см. 5.1.1.1 или к 225 см^3, или к 900 см^3 охлажденной среды mTSB (см. 5.1.1).

Конечная концентрация новобиоцина равна 20 мг/дм^3 среды mTSB.

5.2 Первая селективная среда для выделения микроорганизмов: агаровая среда Мак-Конки с сорбитом и суплементом CT (цефиксим и теллурит калия) (CT-SMAC)

5.2.1 Основная среда

Состав:

Ферментативный перевар казеина . . . . . 17,0 г.
Ферментативный перевар животных тканей . . . . . 3,0 г.
Сорбит . . . . . 10,0 г.
Желчные соли No. 3 . . . . . 1,5 г.
Хлорид натрия . . . . . 5,0 г.
Нейтральный красный . . . . . 0,03 г.
Кристаллический фиолетовый . . . . . 0,001 г.
Агар . . . . . 9—18 г.*
Дистиллированная вода . . . . . 1 000 см^3.

5.2.1.1 Приготовление среды

Растворяют основные компоненты или готовую дегидратированную основу в воде, при необходимости кипятят. Устанавливают уровень pH (см. 6.6), если необходимо, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,1 ± 0,2) при температуре 25 °C, стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве (см. 6.1) при температуре 121 °C.

5.2.2 Раствор теллурита калия

Состав:

Теллурит калия для бактериологического исследования . . . . . 0,25 г.
Дистиллированная вода . . . . . 100 см^3.

5.2.2.1 Приготовление

Растворяют теллурит калия в воде и стерилизуют фильтрованием через микропористую мембрану.

Раствор можно хранить при комнатной температуре в течение 1 мес, но, если образуется белый осадок, его не применяют.

5.2.3 Раствор цефиксима

Состав:

Цефиксим . . . . . 5,0 мг.
Дистиллированная вода . . . . . 100,0 см^3.

5.2.3.1 Приготовление раствора

Растворяют цефиксим в воде и стерилизуют фильтрованием через микропористую мембрану.

Примечание — Возможно, цефиксим надо будет растворить в этаноле.

Этот раствор хранят при температуре (3 ± 2) °C в течение 1 нед.

5.2.4 Готовая питательная среда

Состав:

Основная среда (см. 5.2.1) . . . . . 1 000 см^3.
Раствор теллурита калия (см. 5.2.2) . . . . . 1,0 см^3.
Раствор цефиксима (см. 5.2.3) . . . . . 1,0 см^3.

5.2.4.1 Приготовление среды

Основную среду сразу же после стерилизации или охлаждают (см. 5.2.1) до температуры от 44 °C до 47 °C (см. 6.5), или расплавляют ее, пропаривая предварительно стерилизованную и застывшую основную среду, а затем охлаждают до температуры от 44 °C до 47 °C.

Добавляют 1 см^3 раствора теллурита и 1 см^3 раствора цефиксима к 1000 см^3 основной среды. Перемешивают и разливают приблизительно по 15 см^3 в стерильные чашки Петри (см. 6.15). Оставляют застывать.

Окончательная концентрация теллурита составляет 2,5 мг/дм^3, а цефиксима — 0,05 мг/дм^3.

---

* В зависимости от прочности геля.

Непосредственно перед употреблением чашки с агаром высушивают, сняв крышки и перевернув их вверх дном, *в сушильном шкафу* при температуре от 25 °С до 50 °С (см. 6.2), пока с поверхности среды не исчезнут все капли. Чашки с агаром можно также сушить в защитном шкафу с ламинарным потоком в течение 30 мин с приоткрытыми крышками или оставить на ночь с закрытыми крышками.

Приготовленные заранее невысушенные чашки можно хранить в темных пластиковых пакетах или в других сохраняющих влагу контейнерах в холодильнике при температуре (3 ± 2) °С в течение двух недель.

5.3 Вторая селективная среда для выделения микроорганизмов

По выбору лаборатории используют любую другую твердую селективную среду дополнительно к агару CTSMAC и специально предназначенную для выделения Escherichia coli O157.

Непосредственно перед употреблением чашки с агаром высушивают (см. 5.2.4.1).

Приготовленные заранее невысушенные чашки можно хранить в темных пластиковых пакетах или в других сохраняющих влагу контейнерах в холодильнике при температуре (3 ± 2) °С в течение такого срока, который не приведет к изменению их характеристик.

5.4 Питательный агар

Состав:

Мясной экстракт . . . . . 3,0 г.
Пептон . . . . . 5,0 г.
Агар . . . . . 9—18 г.*
Дистиллированная вода . . . . . 1 000 см^3.

5.4.1 Приготовление питательного агара

Растворяют компоненты или готовую дегидратированную основу среды в воде, при необходимости подогревают. Устанавливают уровень pH, так, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,0 ± 0,2) при температуре 25 °С.

Переносят среду в колбы или склянки (см. 6.7) соответствующей вместимости.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве (см. 6.1) при температуре 121 °С.

5.4.2 Приготовление чашек с питательным агаром

Переносят 15 см^3 расплавленной, охлажденной среды (см. 5.4.1) при температуре от 44 °С до 47 °С (см. 6.5) в чашки Петри и оставляют застывать.

Непосредственно перед употреблением чашки с агаром высушивают (см. 5.2.4.1).

Приготовленные заранее невысушенные чашки можно хранить в темных пластиковых пакетах или в других сохраняющих влагу контейнерах в холодильнике при температуре (3 ± 2) °С в течение двух недель.

5.5 Триптон/триптофановая среда

Состав:

Триптон . . . . . 10,0 г.
Хлорид натрия . . . . . 5,0 г.
DL-Триптофан . . . . . 1,0 г.
Дистиллированная вода . . . . . 1 000 см^3.

5.5.1 Приготовление среды

Растворяют компоненты в воде, доводят до кипения. Устанавливают уровень pH (см. 6.6) так, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,5 ± 0,2) при температуре 25 °С.

Разливают по 5 см^3 в пробирки (см. 6.7) соответствующей вместимости.

Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве (см. 6.1) при температуре 121 °С.

5.6 Реактив Ковача на индол

Состав:

4-диметиламинобензальдегид . . . . . 5,0 г.
2-метилбутан-1-ol или пентан-1-ol . . . . . 75,0 см^3.
Соляная кислота (ρ20 от 1,18 до 1,19 г/см^3) . . . . . 25,0 см^3.

5.6.1 Приготовление реактива

Растворяют 4-диметиламинобензальдегид в спирте, при необходимости подогревая на водяной бане (см. 6.5), поддерживающей температуру от 44 °С до 47 °С. Охлаждают до комнатной температуры и добавляют соляную кислоту.

Защищают реактив от света в стеклянном флаконе из коричневого стекла и хранят при температуре (3 ± 2) °С.

Цвет реактива — от светло-желтого до светло-коричневого без осадка.

---

* В зависимости от прочности геля.

5.7 Иммуномагнитные частицы, связанные с антителами к Escherichia coli O157

Иммуномагнитные частицы, связанные со специфическими антителами к палочке E. coli O157, для концентрации и сепарации этих микроорганизмов.

Примечание — При подготовке иммуномагнитных частиц к использованию необходимо соблюдать инструкции изготовителя.

5.8 Промывочный буфер: модифицированный фосфатный буфер молярной концентрации 0,01 моль/дм^3, уровень pH 7,2

Состав:

Хлорид натрия . . . . . 8,0 г.
Хлорид калия . . . . . 0,2 г.
Вторичный кислый фосфат натрия (безводный) . . . . . 1,44 г.
Первичный кислый фосфат калия (безводный) . . . . . 0,24 г.
Полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат (сироп Tween 20) . . . . . 0,2 см^3.
Дистиллированная вода . . . . . 1 000 см^3.

5.8.1 Приготовление буфера

Растворяют компоненты в воде. Устанавливают уровень pH (см. 6.6) (7,2 ± 0,2) при температуре 25 °С.

Разливают в колбы (см. 6.7) и стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве (см. 6.1) при температуре 121 °С. Раствор может быть мутным, но становится прозрачным после отстаивания.

Допускается использовать готовый фосфатный буфер того же состава и с теми же характеристиками.

5.9 Физиологический раствор

Состав:

Хлорид натрия . . . . . 8,5 г.
Дистиллированная вода . . . . . 1 000 см^3.

5.9.1 Приготовление раствора

Растворяют хлорид натрия в воде. Разливают в колбы и стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при температуре 121 °С.

5.10 Антисыворотка против Escherichia coli O157

Антисыворотку можно приобрести в специальных лабораториях или купить как выделенный соматический серотип O157.

Антисыворотка должна быть протестирована на неизвестные культуры с помощью положительных и отрицательных контролей.

6 Оборудование и лабораторная посуда

Обычное оборудование для микробиологических исследований — по ГОСТ Р ИСО 7218.

6.1 Оборудование для стерилизации сухим жаром (печь) и/или стерилизации паром (автоклав).

6.2 Сушильный шкаф или термостат, поддерживающий температуру от 25 °С до 50 °С.

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

6.4 Инкубатор, поддерживающий температуру (41,5 ± 1) °С.

6.5 Водяная баня, поддерживающая температуру от 44 °С до 47 °С.

6.6 pH-метр, с разрешением 0,01 единиц pH при температуре 25 °С, измеряющий с точностью ± 0,1.

6.7 Пробирки, колбы или склянки, соответствующей вместимости, для стерилизации и хранения питательных сред и инкубации жидких сред.

6.8 Мерные цилиндры соответствующей вместимости для приготовления разведений и готовых сред.

6.9 Градуированные пипетки с полным сливом, номинальным объемом 1 см^3 и 10 см^3, градуированные на 0,1 см^3 и 0,5 см^3 соответственно.

6.10 Петли и иглы, изготовленные из платино-ирридиевого или никель-хромового сплава, или пипетки Пастера, или петли одноразового использования.

6.11 Механические пипетторы с воздухозамещением, стерильные, с рабочим диапазоном от 20 до 200 мкл и делениями на 10 мкл, или аналогичные.

6.12 Магнитный сепаратор с магнитным штативом, для концентрации иммуномагнитных частиц, применяемый для пробирок (см. 6.13).

6.13 Пробирки полипропиленовые типа Эппендорф, с навинчивающимся колпачком, стерильные, одноразовые, центрифужные, вместимостью 1,5 $см^3$, подходящие для магнитного штатива.

Следует избегать образования аэрозолей при открытии.

6.14 Роторный смеситель (работающий в режиме авторотации, смеситель проб крови), вращающийся со скоростью от 15 до 20 об/мин.

6.15 Чашки Петри, диаметром 90 и 140 мм.

6.16 Смеситель типа Вортекс.

7 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с ГОСТ Р 53430, ГОСТ 26668. Рекомендуется перед хранением пробу быстро остудить.

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

8 Подготовка проб

Подготовку проб проводят в соответствии с ГОСТ Р 51426, ГОСТ Р 51448, ГОСТ Р 53430, ГОСТ 26669.

9 Методика проведения испытания по схеме, приведенной в приложении А

9.1 Проба для анализа и исходная суспензия

Для приготовления исходной суспензии пробу для анализа (г или $см^3$) добавляют к модифицированному триптон-соевому бульону с новобиоцином (mTSB + N) объемом 9 $см^3$ или массой 9 г, предварительно нагретого в инкубаторе до температуры 41,5 °С, чтобы проба для анализа была в соотношении с mTSB + N как 1/10 (масса к объему или объем к объему).

Рекомендуется использовать пакеты Стомахер с сетчатыми вставками для снижения интерференции пищевых частиц с набором реактивов для иммунозахвата (см. 9.3).

9.2 Обогащение

Инкубируют (см. 6.4) исходную суспензию, приготовленную в соответствии с 9.1, при температуре 41,5 °С в течение 6 ч, а затем еще в течение 12—18 ч (фактическая продолжительность от 18 до 24 ч).

6-часовая инкубация, за которой следуют иммуномагнитная сепарация и посев на чашки с селективным агаром, может дать положительный результат обнаружения презумптивных бактерий, который может стать отрицательным после дальнейшей 18-часовой инкубации.

9.3 Иммуномагнитная сепарация

9.3.1 Общие требования

Иммуномагнитную сепарацию следует проводить спустя 6 ч после инкубации и еще раз, если необходимо, после 12—18 ч инкубации.

Для иммунозахвата необходимо следовать инструкциям изготовителя в отношении методики и метода применения набора реактивов и оборудования.

9.3.2 Иммунозахват

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! — Используют только асептические методы, чтобы избежать любого внешнего загрязнения и образования аэрозолей. Выполняют эту *процедуру* в защищенной от загрязнений камере, если имеется. Работают в перчатках.

Используя магнитный сепаратор (см. 6.12) и иммуномагнитные частицы, связанные с антителами к E. coli O157, выполняют следующую процедуру захвата/сепарации.

Смешивают обогатительную культуру (см. 9.2) и оставляют для осаждения всех крупных пищевых частиц. В полипропиленовую пробирку типа Эппендорф (см. 6.13) добавляют 20 мкл подготовленных иммуномагнитных частиц (5.7) при комнатной температуре. Отделяют 1 $см^3$ верхнего слоя жидкости от обогатительной культуры, стараясь, по возможности, избегать попадания любых пищевых частиц или жировых включений, и переносят в полипропиленовую пробирку типа Эппендорф.

Перемешивают суспензию в роторном смесителе (см. 6.14) со скоростью вращения приблизительно от 12 до 20 мин$^{-1}$ в течение 10 мин.

9.3.3 Сепарация

Устанавливают каждую полипропиленовую пробирку типа Эппендорф (см. 9.3.2) в магнитный штатив (см. 6.12) и дают магнитным частицам скопиться около магнита, слегка покачивая штатив на 180°. Осторожно открывают колпачок, стараясь не задеть частицы на стенке пробирки. Используя каждый раз новую стерильную пипетку Пастера (см. 6.10) для каждой пробы, с пробиркой в магнитном штативе, удаляют жидкость, медленно отсасывая ее со дна пробирки. Добавляют 1 см^3 стерильного промывочного буфера (см. 5.8) и закрывают колпачком. Удаляют магнит из штатива. Перемешивают содержимое пробирок, осторожно поворачивая штатив на 180°, и затем возвращают магнит на штатив.

Следует соблюдать осторожность, чтобы избежать перекрестного загрязнения при добавлении свежего буфера.

Продолжают процедуру, как описано выше, чтобы удалить промывочную жидкость новой пипеткой Пастера для каждой пробы. Повторяют процедуру промывки несколько раз.

Вынимают из магнитного сепаратора, добавляют 100 мкл стерильного промывочного буфера в пробирку и ресуспендируют магнитные частицы.

Примечание — Эту процедуру трудно применять к жирным продуктам или свежим сырам.

9.4 Посев на чашки с селективным агаром и идентификация колоний E. coli O157

9.4.1 Посев на чашки

С помощью механического пипеттора (см. 6.11) переносят 50 мкл промытых и ресуспендированных магнитных частиц на предварительно высушенную чашку с агаровой средой Мак-Конки с сорбитом и суплементом СТ (цефиксим и теллурит калия) (см. 5.2), а также 50 мкл на предварительно высушенную чашку с второй селективной средой для выделения микроорганизмов (см. 5.3).

Делают посев частиц штрихом, используя стерильную петлю (см. 6.10), для получения множества хорошо изолированных колоний на поверхности агара.

Инкубируют в термостате CT-SMAC при температуре 37 °С в течение 18—24 ч, а также инкубируют вторую селективную среду для выделения при тех же температуре и времени.

В зависимости от типа пищевой пробы и ее микробиологической флоры инкубация обогатительного бульона в течение 20—24 ч может привести к бурному росту других бактерий на чашках с селективным агаром, что затруднит обнаружение колоний E. coli O157. Инокуляция селективных агаров с разведениями препаратов для иммуномагнитной сепарации или объемами меньше 50 мкл на чашку может увеличить шанс получения изолированных колоний E. coli O157 и предел обнаружения.

9.4.2 *Идентификация* типичных колоний E. coli O157

На агаре Мак-Конки типичные колонии бывают прозрачными и почти бесцветными с бледными желтовато-коричневыми проявлениями и диаметром приблизительно 1 мм.

Исследуют вторую селективную агаровую среду для выделения типичных колоний E. coli O157, следуя инструкциям изготовителя.

9.5 *Подтверждение идентификации*

Можно использовать имеющиеся в продаже миниатюрные биохимические наборы для идентификации сорбит-отрицательных и индол-положительных бактерий E. coli и наборов для идентификации E. coli O157 методом латекс-агглютинации при условии, что для подтверждения проводятся соответствующие тесты с известными положительными и отрицательными штаммами.

9.5.1 Отбор колоний

С каждой чашки отбирают пять типичных колоний, как указано в 9.4. Если чашка с агаром содержит менее 5 типичных колоний, необходимо исследовать все колонии.

Засевают штрихом каждую выбранную колонию на чашку с питательным агаром (см. 5.4), чтобы дать возможность разрастись хорошо выделенным колониям.

Инкубируют (см. 6.3) чашки в течение 18—24 ч при температуре 37 °С.

Для тестов используют только чистые культуры из чашки с питательным агаром, как описано в 9.5.2 и 9.5.3.

9.5.2 Биохимическая *идентификация* (образование индола)

Инокулируют одну колонию из чистой культуры на питательный агар (см. 9.5.1) в пробирку с триптон/триптофановой средой (см. 5.5).

Инкубируют (см. 6.3) при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Добавляют 1 см^3 реактива Ковача (см. 5.6) и оставляют при комнатной температуре в течение 10 мин.

Появление красного цвета указывает на положительную реакцию. Желто-коричневый цвет указывает на отрицательную реакцию.

9.5.3 Серологическая идентификация

9.5.3.1 Общее требование

Исследуют только индол-положительные колонии на серологическую реакцию с антисывороткой против E. coli O157.

9.5.3.2 Выделение автоагглютинирующих штаммов

Одну каплю солевого раствора (см. 5.9) капают на чистое предметное стекло.

Используя петлю (см. 6.10), подмешивают к этой капле одну колонию из чашки с питательным агаром (см. 9.5.1), чтобы получилась однородная и мутная суспензия.

Осторожно встряхивают стекло в течение 30—60 с. Наблюдают за результатом на темном фоне и, в случае необходимости, с помощью увеличительных линз.

При обнаружении в суспензии видимых скоплений бактерий считается, что штамм способен автоагглютинировать и далее не должен тестироваться, так как реакция со специфической антисывороткой невозможна.

9.5.3.3 Реакция с антисывороткой против E. coli O157

Используя чистую культуру из питательного агара (см. 9.5.1), суспендируют ее в свежей капле солевого раствора, как описано в 9.5.3.2, и добавляют маленькую каплю антисыворотки против E. coli O157 (см. 5.10).

Реакция является положительной, если агглютинация проявляется в течение 1 мин.

9.5.3.4 Положительная идентификация

Считать положительными те штаммы, которые дают положительную реакцию на индол и реагируют либо с антисывороткой против O157, либо с антисыворотками против O157 плюс H7, если имеется.

10 Обеспечение качества *испытания*

10.1 Испытуемые штаммы

Для обеспечения качества штаммы E. coli O157, которые не имеют коэффициентов вирулентности, характерной для патогенности, можно получить из национальных или международных коллекций культур. Их рекомендуется применять для испытания сред и антисывороток.

10.2 Культуральный метод

Для проверки возможности лаборатории и среды обнаруживать низкое содержание бактерий Escherichia coli O157 в пищевых пробах, подлежащих анализу с помощью метода, описанного в настоящем стандарте, контрольные пробы инокулята низкой концентрации непатогенных E. coli O157 и высокой концентрации другого штамма E. coli должны исследоваться параллельно с пробой для анализа.

11 Выражение результатов

Для интерпретации результатов следует представить данные о присутствии или отсутствии бактерии Escherichia coli O157 в пробе для анализа, указав массу в г или объем в см^3.

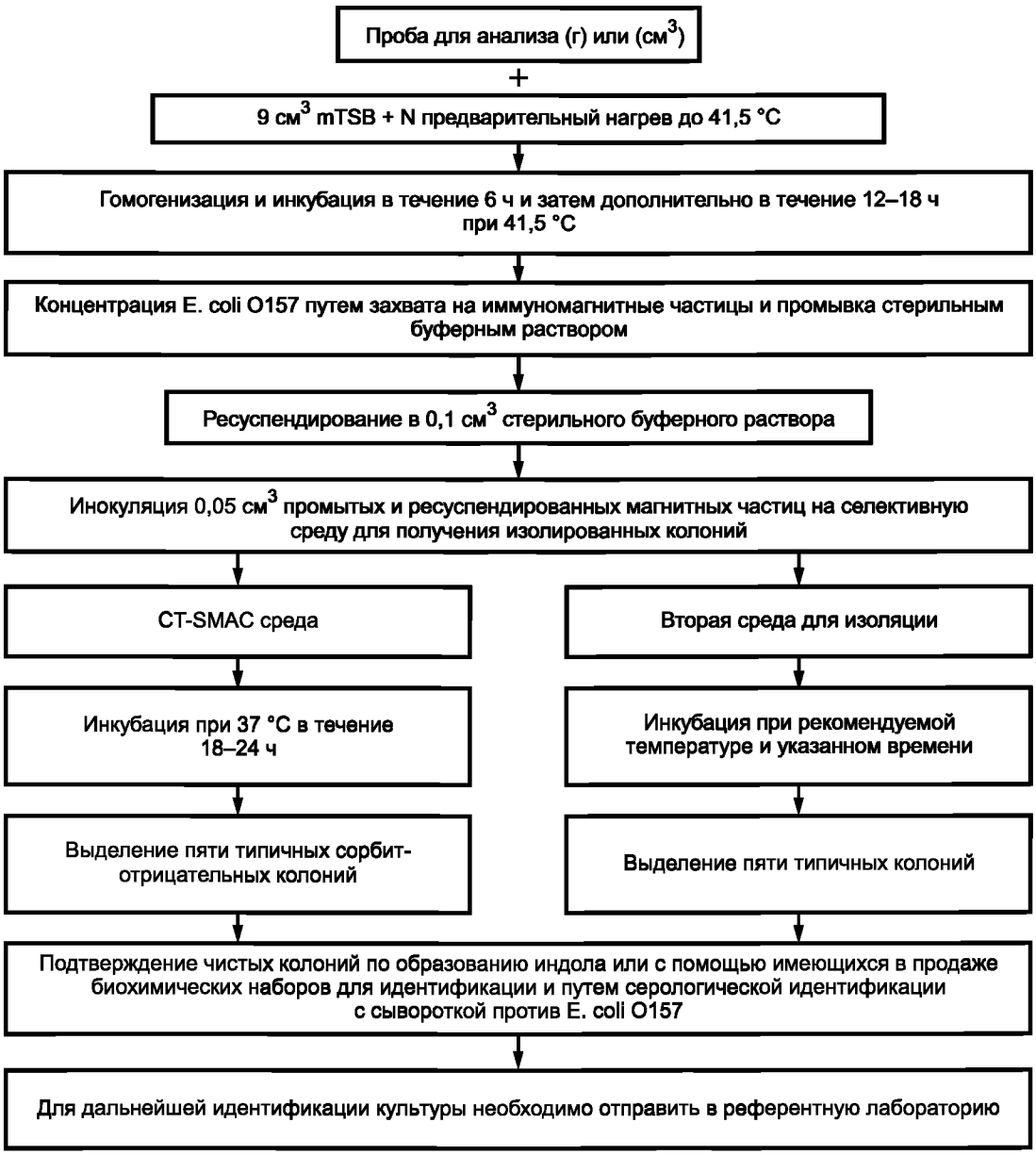
12 Протокол испытания

В протоколе испытания указывают:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- используемый метод отбора проб (если известен);
- используемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;
- температуру инкубации;
- все детали исследования, не оговариваемые в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также детали иного свойства, могущие оказать влияние на результаты исследований;
- полученные результаты.

Приложение А
(обязательное)

Схема методики проведения испытания



Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных национальных и межгосударственных стандартов международным стандартам, использованным в качестве ссылочных в примененном международном стандарте

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного национального, межгосударственного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта
ГОСТ Р ИСО 7218—2008	MOD	ИСО 7218—85* «Микробиология. Общее руководство по микробиологическим исследованиям»
ГОСТ Р 51426—99 (ИСО 6887—83)	MOD	ИСО 6887—83** «Микробиология. Общее руководство по приготовлению разбавлений для микробиологического исследования»
ГОСТ Р 51448—99 (ИСО 3100-2—88)	MOD	ИСО 3100-2—88*** «Мясо и мясные продукты. Отбор проб и подготовка опытных проб. Часть 2. Подготовка опытных проб для микробиологических исследований»
ГОСТ Р 53430—2009	—	—
ГОСТ 26668—85	—	—
ГОСТ 26669—85	—	—
Примечание — В настоящей таблице использовано следующее обозначение степени соответствия стандартов: - MOD — модифицированные стандарты.		

* Заменен на ИСО 7218:2008.
** Заменен на ИСО 6887-2:2003.
*** Заменен на ИСО 6887-2:2003.

УДК 663/664.777:006.354 ОКС 07.100.30 Н09 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: пищевые продукты, корма, микробиология, метод обнаружения, бактерии Escherichia coli O157, питательные среды, индол, типичные колонии, результаты идентификации

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 29.09.2011. Подписано в печать 23.11.2011. Формат 60x84 1/8. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 1,86.
Уч.-изд. л. 1,35. Тираж 211 экз. Зак. 1122.

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