
**Микробиология пищевых продуктов и
кормов для животных.
Горизонтальный метод обнаружения и
подсчета бактерий *Campylobacter spp.***

Часть 3.

Полуколичественный метод

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
detection and enumeration of Campylobacter spp. —*

*Part 3:
Semi-quantitative method*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO/TS 10272-3:2010(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO или IDF не несут никакой ответственности в этом отношении.

Adobe – торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованные для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO и национальными комитетами IDF. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO/TS 10272-3:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2010

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие.....	iv
Введение	v
1 Область применения.....	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения.....	2
4 Принцип	2
5 Питательные среды и реактивы	2
6 Аппаратура	3
7 Отбор проб	4
8 Приготовление испытуемой пробы	4
9 Методика.....	4
9.1 Общие положения	4
9.2 Проба для анализа, исходная суспензия и разбавления	4
9.3 Обогащение	5
9.4 Изоляция.....	5
9.5 Подтверждение вида <i>Campylobacter</i> spp.	5
9.6 Идентификация вида <i>Campylobacter</i> spp. (альтернативная процедура)	6
10 Расчет и выражение результатов	8
10.1 Метод расчета	8
10.2 Прецизионность.....	9
11 Протокол испытания.....	9
Приложение А (нормативное) Диаграмма методики.....	10
Приложение В (нормативное) Состав и приготовление питательных сред и реактивов.....	11
Библиография	17

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, приведенным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимавших участие в голосовании.

При других обстоятельствах, особенно когда существует срочная потребность рынка в таких документах, технический комитет может принять решение о публикации других типов нормативного документа:

- общедоступные технические условия ISO (ISO/PAS) представляют собой соглашение между техническими экспертами в рабочей группе ISO и принимаются к публикации после одобрения более чем 50 % членов основного комитета, участвующих в голосовании;
- технические условия ISO (ISO/TS) представляют собой соглашение между членами технического комитета и принимаются к публикации после одобрения 2/3 членов комитета, участвующих в голосовании.

Документы ISO/PAS или ISO/TS рассматриваются спустя три года для принятия решения, в соответствии с которым они либо утверждаются на последующие три года, либо пересматриваются и преобразовываются в Международный стандарт, либо аннулируются. Если документ ISO/PAS или ISO/TS одобряется, то он пересматривается снова через три года, в течение которых документ должен быть либо преобразован в Международный стандарт, либо аннулирован.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. ISO не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав.

ISO/TS 10272-3 разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 9, *Микробиология*.

ISO 10272 состоит из следующих частей под общим названием *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter spp.**

- *Часть 1. Метод обнаружения*
- *Часть 2. Метод подсчета колоний* [Технические условия]
- *Часть 3. Полуколичественный метод* [Технические условия]

Введение

Принимая во внимание большое разнообразие пищевых продуктов и кормов, ISO 10272 не может быть применен во всех деталях к некоторым видам продукции, а для некоторых других видов продукции может потребоваться использование других методов.

Вместе с тем во всех случаях следует предпринимать попытки применения, по мере возможности, ISO 10272, а какие-либо отклонения от него могут быть обоснованы исключительно в силу технических причин.

При последующем пересмотре ISO 10272 во внимание будет принята вся имеющаяся информация относительно пределов применения этих методов и доводы в пользу отступления от них в случае анализа конкретных видов продукции. Гармонизация методов испытаний не может быть осуществлена в ближайшее время, а в отношении некоторых групп продукции уже существуют международные стандарты и/или национальные стандарты, которые не согласуются с ISO 10272. Выражается пожелание, что в период пересмотра этих стандартов в них будут внесены изменения с целью приведения их в соответствие с ISO 10272 с тем, чтобы в итоге только оставшиеся отклонения были действительно обоснованы по установленным техническим причинам.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 10272-3:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>

Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter spp.*

Часть 3. Полуколичественный метод

1 Область применения

Настоящая часть ISO 10272 содержит описание горизонтального метода полуколичественного определения *Campylobacter spp.*

Она применима к продукции, предназначенной для потребления человеком или кормления животных, и к пробам окружающей среды в сфере производства и обращения с пищевой продукцией. Однако возможно, что данная часть ISO 10272 не применима во всех деталях к некоторым видам продукции, поэтому отклонения от них по техническим причинам становятся необходимыми. Возможно, что данная часть ISO 10272 совсем не применима к некоторым другим видам продукции.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

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

ISO 7218, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям*

ISO/TS 11133-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории*

ISO/TS 11133-2:2003, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по определению эффективности питательных сред*

3 Термины и определения

В настоящем документе используются следующие термины и определения.

3.1

Campylobacter

Campylobacter

⟨микробиология пищевых и кормовых *Campylobacter*⟩ род микроорганизмов, образующих характерные колонии на твердых селективных средах, когда их инкубируют микроаэробным способом при температуре 41,5 °C, но не при 25 °C, и которые обладают характерной подвижностью, биохимическими свойствами и способностью к росту, описанными в тех случаях, когда испытания проводятся в соответствии с настоящей частью ISO 10272

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

3.2

полуколичественное определение

semi-quantitative determination

⟨микробиология пищевых и кормовых *Campylobacter*⟩ определение уровня загрязнения *Campylobacter* в том случае, когда ожидается низкое количество или если уровень сопутствующей флоры относительно высок

4 Принцип

4.1 Общие положения. Для полуколичественного определения *Campylobacter* spp. необходимы операции, описанные в 4.2 – 4.4 (см. Рисунок А.1).

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

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

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

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

5 Питательные среды и реактивы

5.1 Общие положения. Для получения информации об общепринятой лабораторной практике см. ISO 7218, ISO/TS 11133-1 и ISO/TS 11133-2.

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

5.2 Жидкая обогатительная среда: бульон Болтона. См. В.1.

5.3 Селективная среда для чашек Петри: модифицированный агар с углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (mCCD агар). См. В.2.

5.4 Среды и реактивы для подтверждения и идентификации.

- 5.4.1 Колумбийский кровяной агар. См. В.3.
- 5.4.2 Бульон для бруцелл. См. В.4.
- 5.4.3 Реактив для обнаружения оксидазы. См. В.5.
- 5.4.4 Раствор пероксида водорода, 3 % (объемная доля).
- 5.4.5 Реактивы для определения гидролиза гиппурата. См. В.6.
- 5.4.6 Кровяной агар Мюллера-Хинтона. См. В.7.
- 5.4.7 Диск с налидиксовой кислотой и цефалотином. Каждый тип диска содержит по 30 мкг реактива.
- 5.4.8 Диск с индоксилацетатом. См. В.8.

6 Аппаратура

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

- 6.1 Оборудование для сухой стерилизации (сушильный шкаф) или влажной стерилизации (автоклав). См. ISO 7218.
 - 6.2 Сушильный шкаф, ламинарный бокс или термостат, способные функционировать в диапазоне температур от 37 °C до 55 °C.
 - 6.3 Термостат, работающий при (25 ± 1) °C, (37 ± 1) °C и $(41,5 \pm 1)$ °C.
 - 6.4 Водяная баня, работающая при (37 ± 1) °C.
 - 6.5 Водяная баня, работающая в диапазоне от 47 °C до 50 °C.
 - 6.6 рН-метр, с точностью до 0,1 рН при 25 °C.
 - 6.7 Емкости, в частности, культуральные пробирки с размерами 18 мм × 180 мм и 9 мм × 180 мм, пробирки для гемолиза с размерами 13 мм × 75 мм, бутылки с нетоксичными металлическими крышками и/или колбы подходящей вместимости с соответствующими крышками.
 - 6.8 Чашки Петри, стеклянные или пластиковые, диаметром 90 мм – 100 мм.
 - 6.9 Градуированные пипетки, поставляющие полный объем, с широким отверстием, номинальной вместимостью 1 мл и 10 мл, градуированные с ценой деления 0,1 мл, ISO 835 ^[1] класс А, и пастеровские пипетки, ISO 7712 ^[2].
 - 6.10 Резиновые соски, или любая другая безопасная система, которую можно адаптировать к градуированным пипеткам.
 - 6.11 Стерильные петли, из платиново-иридиевого или никелево-хромового сплава либо пластиковые, диаметром приблизительно 3 мм, и проволоки из того же материала или стеклянная или пластиковая палочка.
- Петля из никелево-хромового сплава не пригодна для использования в испытании на оксидазу (см. 9.5.6).
- 6.12 Пинцет, тонкий, с закругленными краями, из нержавеющей стали.

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

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

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Соответствующая микроаэробная атмосфера может быть получена при использовании имеющихся в продаже газогенераторных комплектов; следует в точности соблюдать инструкции изготовителя, особенно те из них, которые касаются объема сосуда и вместимости газогенераторного комплекта. В качестве альтернативы можно использовать заполнение сосуда надлежащей газовой смесью перед инкубацией.

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

7 Отбор проб

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

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящей части ISO 10272. См. конкретный международный стандарт, распространяющийся на данную продукцию. Если не существует конкретного международного стандарта, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по данному вопросу.

Принимая во внимание, что *Campylobacter* spp. весьма чувствительны к замораживанию, но лучше выживают при низких температурах, рекомендуется, чтобы пробы не хранились при температуре $(+3 \pm 2)$ °C и анализировались в кратчайшие сроки. Также принимают меры по предотвращению высыхания проб.

8 Приготовление испытуемой пробы

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

9 Методика

9.1 Общие положения

См. Рисунок А.1.

9.2 Проба для анализа, исходная суспензия и разбавления

9.2.1 Вводят пробу для анализа в количестве x г или x мл (минимум 15 г или 15 мл) из испытуемой пробы (Раздел 8) в восьмикратный объем (120 мл минимум) обогатительной среды – бульон Болтона (5.2) и гомогенизируют.

Полученная суспензия является исходной суспензией.

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

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

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

9.3 Обогащение

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

9.4 Изоляция

9.4.1 Используя каждую из культур, полученных в обогатительной среде (9.2), инокулируют стерильной петлей (6.11) поверхность слоев с селективной изолирующей средой на основе mCCD агара (5.3).

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

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

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

9.5 Подтверждение вида *Campylobacter* spp.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>

9.5.1 Общие положения

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

9.5.2 Отбор колонии для подтверждения

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

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

9.5.3 Исследование морфологии и подвижности

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

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