
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

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

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 °C, но не при 25 °C, 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).

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 обогащательную 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 обогащательная 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 (авто-клав) по ИСО 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 температуре $(41,5 \pm 1)$ °C.6.4 Водяные бани, работающие в диапазоне температур (25 ± 1) °C и (37 ± 1) °C, или термостаты, работающие в диапазоне температур (25 ± 1) °C и (37 ± 1) °C.

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

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

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 см³, градуированные с делениями 0,1 см³, 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 см³, используемые для обогащательного 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 обогащательный бульон можно инкубировать в бутылках с винтовыми крышками или колбах, заполнив их обогащательным 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, испытываемые пробы не замораживают и хранят при температуре (3 ± 2) °C. Их анализируют в кратчайшие сроки. Также принимают меры по предотвращению высыхания проб.

8 Приготовление испытуемой пробы

Испытуемую пробу готовят 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 °C в течение 4—6 ч, затем при температуре 41,5 °C 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 °C 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 развиваться четко изолированным колониям. Слои инкубируют в аэробной атмосфере при температуре 41,5 °C в течение 24—48 ч. При исследовании морфологии, подвижности, аэробного роста при температуре 25 °C, аэробного роста при температуре 41,5 °C 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 см³ 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 °C

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 °C 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 °C

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 °C 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 изогнутые бациллы
Подвижность (9.4.3)	Характерная
Микроаэробный рост при температуре 25 °C (9.4.4)	—
Аэробный рост при температуре 41,5 °C (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 °C, чаще всего встречаются *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli*. Вместе с тем были описаны другие виды (*Campylobacter lari*, *Campylobacter upsallensis* 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 °C 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 °C 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 см³ 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 см³ 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	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
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 см³ продукта по ИСО 7218.

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

Приложение А
(обязательное)

Диаграмма методики работы

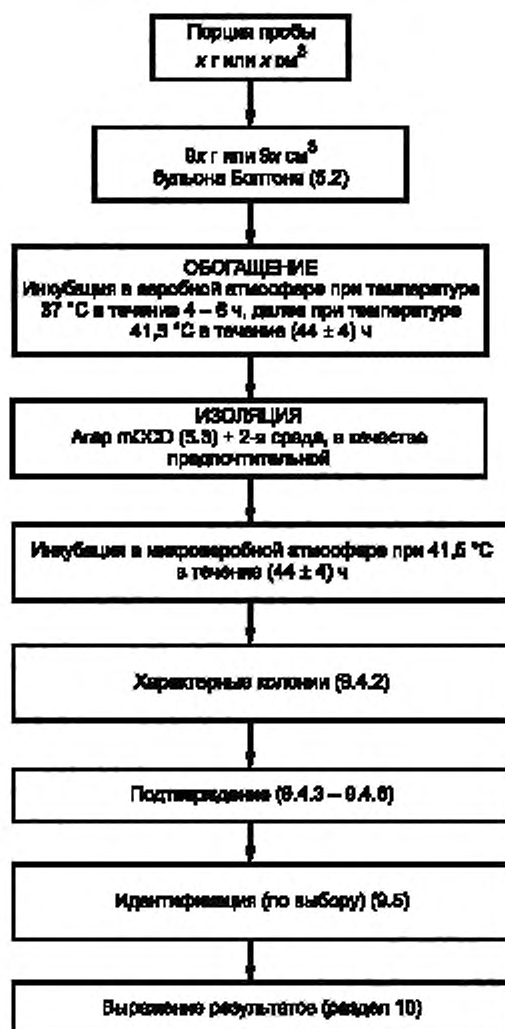


Рисунок А.1

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 см³.

В.1.1.2 Приготовление

Базовые компоненты по В.1.1.1 или готовую обезвоженную среду растворяют в 1000 см³ воды при слабом нагреве.

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

Среду разливают в колбы вместимостью 100—200 см³. Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 121 °С в течение 15 мин.

В.1.2 Стерильная лизированная дефибрированная 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;
 триметоприм лактат — 0,02 г;
 амфотерицин В — 0,01 г;
 этанол/стерильная дистиллированная вода 50:50 (по объему) — 5,0 см³.

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 см³;
 стерильная лизированная дефибрированная кровь лошади (В.1.2) — 50 см³;
 антибиотический раствор (В.1.3) — 5 см³.

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 обогащенную среду готовят 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 ATCC¹⁾ 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 г¹⁾;
 вода — 1000 см³.

V.2.1.2 Приготовление

Компоненты для базовой среды или обезвоженную базовую среду растворяют в 1000 см³ воды и постепенно доводят до кипения. При необходимости, корректируют pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,4 ± 0,2) при температуре 25 °C.

Базовую среду разливают в колбы вместимостью 100—200 см³. Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 121 °C в течение 15 мин.

V.2.2 Антибиотический раствор

V.2.2.1 Состав:

цефалепазон — 0,032 г;
 амфотерицин В — 0,01 г;
 вода — 5 см³.

V.2.2.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде. Стерилизуют путем фильтрации.

V.2.3 Полная среда

V.2.3.1 Состав:

базовая среда (V.2.1) — 1000 см³;
 антибиотический раствор (V.2.2) — 5 см³.

V.2.3.2 Приготовление

Антибиотический раствор добавляют к базовой среде, охлажденной до температуры 47 °C — 50 °C, затем тщательно перемешивают. Разливают по 15 см³ 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) °C не более семи дней.

V.2.4 Эксплуатационное испытание

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

V.3 Колумбийский кровяной агар

V.3.1 Базовая среда

V.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 г¹⁾;
 вода — 1000 см³.

V.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 °C. Базовую среду распределяют в колбы подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве (6.1), установленном на 121 °C, в течение 15 мин.

V.3.2 Стерильная дефибрированная баранья кровь

V.3.3 Полная среда

V.3.3.1 Состав:

базовая среда (V.3.1) — 1000 см³;
 антибиотический раствор (V.3.2) — 5,0 см³.

V.3.3.2 Приготовление

Кровь в стерильных условиях добавляют к базовой среде, охлажденной до температуры 47 °C — 50 °C, затем перемешивают. Разливают около 15 см³ 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 $(3 \pm 2)^\circ\text{C}$.

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 см³.

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 $(7,3 \pm 0,2)$ при температуре 25°C . Базовую среду объемом 10 см³ распределяют в колбы подходящей емкости. Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 121°C 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 см³.

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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) — 8,98 г;
натрия дигидрофосфат моногидрат ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) — 2,71 г;
вода — 1000,0 см³.

В.6.1.2 Приготовление

Гиппурат натрия растворяют в растворе PBS. Стерилизуют путем фильтрации. Соблюдая стерильность, реагент объемом 0,4 см³ распределяют в малые колбы надлежащей вместимостью (6.7). Хранят при температуре 20°C .

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

В.6.2.1 Состав:

нингидрин — 1,75 г;
ацетон — 25 см³;
бутанол — 25 см³.

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 г¹⁾;
вода — 1000 см³.

В.7.1.2 Приготовление

Компоненты для среды или готовую обезвоженную базовую среду растворяют в 1000 см³ воды и постепенно доводят до кипения. При необходимости корректируют pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял

¹⁾ В зависимости от прочности геля агара.

($7,3 \pm 0,2$) при температуре 25 °С. Базовую среду разливают в колбы вместимостью 100—200 см³. 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 см³;

стерильная дефибринированная баранья кровь (В.7.2) — 50,0 см³.

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 см³ 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 см³.

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»
<p>* 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.</p> <p>Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:</p> <p>- IDT — идентичные стандарты.</p>		

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 663/664.777:006.354ОКС 07.100.30
67.040

H09

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 60×84¹/₈. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,65. Тираж 201 экз. Зак. 58.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ». 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

