
Качество воды. Выявление бактерий рода *Salmonella* spp.

Water quality — Detection of Salmonella spp.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19250:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>

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



Ссылочный номер
ISO 19250:2010(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 установку интегрированных шрифтов в 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 не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак Adobe Systems Incorporated.

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19250:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2010

Все права сохраняются. Если не задано иначе, 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 офиса ISO по адресу, указанному ниже, или членов ISO в стране регистрации пребывания.

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 Сущность метода	2
5 Аппаратура	4
6 Отбор проб	4
7 Питательные среды и реактивы	4
8 Проведение анализа	5
9 Представление результатов	10
10 Протокол испытания	10
11 Обеспечение качества	11
Приложение А (нормативное) Диаграмма анализа	12
Приложение В (нормативное) Состав (рецептура) и приготовление культуральных сред и реактивов	13
Приложение С (информативное) Результаты межлабораторного эксперимента	20
Библиография	25

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) представляет собой всемирную федерацию, состоящую из национальных органов по стандартизации (комитеты-члены ISO). Работа по разработке международных стандартов обычно ведется Техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в теме, для решения которой образован данный технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, поддерживающие связь с ISO, также принимают участие в работе. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, установленными в Части 2 Директив ISO/IEC.

Основное назначение технических комитетов заключается в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые Техническими комитетами, направляются комитетам-членам на голосование. Для их опубликования в качестве международных стандартов требуется одобрение не менее 75 % комитетов-членов, участвовавших в голосовании.

Внимание обращается на тот факт, что отдельные элементы данного документа могут составлять предмет патентных прав. ISO не несет ответственность за идентификацию каких-либо или всех подобных патентных прав.

ISO 19250 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 147, *Качество воды*, Подкомитетом SC 4, *Микробиологические методы*.

Настоящее издание отменяет и заменяет ISO 6340:1995 после технического пересмотра.

ISO 19250:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>

Введение

Виды бактерий рода *Salmonella* являются бактериями, которые очень широко распространены во всем мире. Обычно их относят к патогенным, хотя их вирулентность и патогенность колеблется в широком диапазоне. Носителями бактерий рода *Salmonella* являются люди, сельскохозяйственный и домашний скот, дикие животные, включая птиц. Люди и животные могут выделять эти бактерии, будучи носителями без выраженных симптомов, а также во время заболевания. Поэтому невозможно устранить их из окружающей среды. После инфицирования животных передача бактерий рода *Salmonella* может вызвать серьезные заболевания.

Поскольку вода признана средством переноса инфекции, наличие или отсутствие бактерий рода *Salmonella* отслеживают в воде, там где подозревают риск заражения. *Salmonella* может присутствовать во всех типах бытовых и сельскохозяйственных сточных вод, пресной воды, включая грунтовые и питьевую воду, а также морскую воду.

Обнаружение бактерий рода *Salmonella* в воде обычно требует этапа концентрирования. Поскольку клетки *Salmonella* могут присутствовать в очень незначительном количестве и наносить вред окружающей водной среде, обнаружение ее в воде обычно требует этапа предварительного обогащения.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19250:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>

Качество воды. Выявление бактерий рода *Salmonella* spp.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Чтобы сохранить здоровье персонала лаборатории, большое значение имеет то, чтобы выявление бактерий рода *Salmonella*, и особенно видов *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi (*Salmonella* ser. Typhi) и *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Paratyphi (*Salmonella* ser. Paratyphi), предпринималось только в надлежащем образом оснащенной лаборатории, под руководством опытного микробиолога, и чтобы особо тщательный контроль осуществлялся в отношении ликвидации всего инкубированного материала.

Пользователи данного международного стандарта должны быть знакомы с обычной лабораторной практикой. Настоящий стандарт не преследует цели рассмотреть все вопросы, связанные с безопасностью, если они возникают при его использовании. Пользователь сам несет ответственность за разработку соответствующих правил техники безопасности и охраны здоровья, а также за обеспечение соответствия условиям национальных регламентов.

ВНИМАНИЕ! Самое главное, чтобы анализ в соответствии с настоящим международным стандартом выполнялся обученным персоналом.

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод выявления бактерий рода *Salmonella* spp. (презумптивных или подтвержденных) в пробах воды. Для эпидемиологических целей или при расширенных исследованиях могут потребоваться другие среды.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Данный метод может выявить не все бактерии *Salmonella* ser. Typhi и ser. Paratyphi.

ПРИМЕЧАНИЕ Для полуколичественного анализа, можно выполнить определение наиболее вероятного числа (MPN=НВЧ), используя соответствующие объемы пробы. Для этих случаев объем пептонной забуференной воды берется соответствующий.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные документы обязательны для применения данного документа. Для датированных ссылок применяется только указанное издание. Для недатированных ссылок применяется самое последнее издание указанного документа (включая все изменения).

ISO 6579, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения сальмонеллы Salmonella spp.*

ISO 6887-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений*

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

ISO 7704, *Качество воды. Оценка мембранных фильтров, используемых для микробиологических анализов*

ISO 8199, *Качество воды. Общее руководство по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде*

ISO 19458, *Качество воды. Отбор проб для микробиологического анализа*

3 Термины и определения

Применительно к данному документу используются следующие термины и определения.

3.1
презюмтивные бактерии рода *Salmonella* spp.
presumptive *Salmonella* spp.
бактерии, которые выращивают на установленной селективной обогатительной среде и образуют типичные или атипичные колонии на твердых селективных средах on the solid selective media

3.2
подтвержденные бактерии рода *Salmonella* spp.
confirmed *Salmonella* spp.
бактерии, которые выращивают на установленной селективной обогатительной среде и образуют типичные и сомнительные колонии на твердых селективных средах, и которые обладают специфическими биохимическими и серологическими признаками

ПРИМЕЧАНИЕ Специфические биохимические и серологические признаки определяются по испытаниям/, описанным в настоящем международном стандарте.

3.3
обнаружение бактерий *Salmonella*
***Salmonella* detection**
определение присутствия или отсутствия микроорганизмов *Salmonella* (3.4)

3.4
сальмонелла
***Salmonella* spp.**
Salmonella
микроорганизмы, которые образуют типичные или атипичные колонии на твердых селективных средах и обладают специфическими биохимическими и серологическими признаками

4 Сущность метода

4.1 Общие положения

Обнаружение бактерий рода *Salmonella* требует четырех последовательных этапов (см. также Приложение А).

Часто требуется предварительное обогащение, чтобы позволить выявление незначительного числа микроорганизмов *Salmonella* или поврежденных микроорганизмов *Salmonella*. Некоторые микроорганизмы *Salmonella* и микроорганизмы, сублетально поврежденные, могут потребовать дополнительного времени инкубирования (4.3). Кроме того, бактерии рода *Salmonella* могут присутствовать в небольших количествах и часто сопровождаются значительно большими количествами других бактерий семейства энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*) или других семейств. Следовательно, требуется селективное обогащение.

4.2 Предварительное обогащение в неселективной жидкой среде

Пептонную забуференную воду (В.1) засевают при температуре окружающей среды известным

объемом пробы или его разведений, затем термостатируют при температуре $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (18 ± 2) ч. Большие объемы можно концентрировать с помощью мембранной фильтрации и помещения после фильтрации мембранного фильтра в пептонную забуференную воду.

ПРИМЕЧАНИЕ Для сточных вод показано, что менее продолжительная инкубация или непосредственный посев пробы на селективную среду (4.3) дает лучшие результаты.

Для полуколичественного анализа, можно выполнить определение наиболее вероятного числа (MPN=НВЧ), используя соответствующие объемы проб. Для этих случаев объем пептонной забуференной воды берется соответствующий

4.3 Обогащение в селективных жидких средах

Питательную среду Раппапорта-Василиадиса (Rappaport-Vassiliadis) (соевый бульон RVS) и тетрациклат-новобиоциновый бульон Мюллера-Кауфмана (Muller-Kauffmann) (МКТТн) засевают культурой, полученной в 4.2.

Бульон RVS термостатируют при температуре $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч, а бульон МКТТн - при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

Для выявления медленно растущих бактерий рода *Salmonella* spp., инкубируют обогатительный бульон в течение дополнительных (24 ± 3) ч до общей продолжительности (48 ± 4) ч при температуре $(41,5 \pm 1,0)^\circ\text{C}$.

ПРИМЕЧАНИЕ Виды *Salmonella* Typhi и *Salmonella* Paratyphi A обычно не представляют интереса в рутинном мониторинге качества воды, но могут иметь значение в эпидемиологических исследованиях. Бульон МКТТн используют для обогащения при инкубировании при температуре $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение до (24 ± 3) ч для большинства штаммов *Salmonella*, включая некоторые штаммы *Salmonella* Paratyphi, однако, он вряд ли подойдет для штаммов *Salmonella* Paratyphi C. Бульон МКТТн не используют, если подозревается наличие бактерий вида *Salmonella* Typhi после использования селенит-цистинового бульона.

4.4 Посев на чашки Петри и идентификация

Культурами, полученными в 4.3, засевают две чашки с плотной (твердой) селективной средой:

- a) дезоксихолатный ксилозо-лизиновый агар (агар XLD);
- b) любая другая плотная селективная среда в дополнение к агару XLD и, если это возможно, подходящую для изолирования лактоза-положительных видов *Salmonella* и штаммов *Salmonella* Typhi и *Salmonella* Paratyphi — лаборатория может сама выбрать среду для использования.

Инкубируют агар XLD при температуре $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ и исследуют спустя (24 ± 3) ч, чтобы проверить на наличие колоний, которые считаются презумптивными для рода *Salmonella*. Инкубируют второй селективный агар в соответствии с рекомендациями изготовителя.

ПРИМЕЧАНИЕ К сведению аналитиков, можно использовать агар с добавлением бриллиантового зеленого (BGA), висмут-сульфитный агар, и т.д., в качестве второй среды для выделения.

4.5 Подтверждение

Колонии пересеянной культуры презумптивных бактерий *Salmonella*, затем высевая в соответствии с 4.4 и подтверждают их идентичность посредством биохимических (8.5.3) и серологических (8.5.4) тестов.

5 Аппаратура

Обычное оборудование для микробиологических исследований (см. ISO 7218) и, в частности, следующее.

5.1 Общие положения. За исключением имеющейся в наличии стеклянной посуды, поставляемой в стерильном состоянии, стерилизуют стеклянную посуду в соответствии с ISO 8199. Лабораторное оборудование однократного применения, если соответствует требуемым спецификациям, является приемлемой альтернативой посуде многоразового использования.

5.2 Автоклав, обеспечивающий поддержание температуры $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ и $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

5.3 Водяная баня или инкубатор (термостат), обеспечивающий поддержание температуры $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

5.4 Водяная баня или инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры $(41,5 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

5.5 Водяные бани, обеспечивающие работу при температуре $(70 \pm 1) ^\circ\text{C}$ и при температуре от $50 ^\circ\text{C}$ до $55 ^\circ\text{C}$.

5.6 Оборудование для мембранной фильтрации, в соответствии с ISO 8199.

5.7 Стерильные мембранные фильтры, с порами номинального размера 0,45 мкм.

Качество мембранных фильтров может зависеть от изготовителя и даже от партии. Поэтому рекомендуется регулярно проверять качество, в соответствии с ISO 7704.

5.8 pH-метр, с точностью калибровки $\pm 0,1$ pH при температуре от $20 ^\circ\text{C}$ до $25 ^\circ\text{C}$.

5.9 Стерильный пинцет.

5.10 Стерильные бактериальные петли для посева, диаметром приблизительно 3 мм (объем 10 мкл), и иглы или проволока для посева культур.

6 Отбор проб

Отбор проб не является частью установленного в настоящем международном стандарте метода. Пробы рекомендуется отбирать в соответствии с ISO 19458.

Большое значение имеет то, чтобы лаборатория получила действительно репрезентативную пробу, которая при транспортировании или хранении не претерпела повреждений или изменений.

7 Питательные среды и реактивы

ПРИМЕЧАНИЕ Для руководства по обеспечению качества и испытаниям на соответствие требованиям, см. ISO/TS 11133-1^[2] и ISO/TS 11133-2^[3].

7.1 Основные материалы. Для единообразия результатов, при приготовлении питательных сред, используют либо обезвоженную полную среду, либо компоненты одинакового качества и реактивы признанной аналитической чистоты.

Можно использовать реактивы других классов чистоты, при условии получения сопоставимых результатов.

7.2 Вода, ISO 3696^[1], класс 3.

7.3 Питательные среды, приготовленные в соответствии с Приложением В.

7.3.1 Пептонная забуференная вода, неселективная обогатительная среда – забуференная пептонная вода (BPW, В.1).

7.3.2 Соевый бульон Раппапорта-Василиадиса (соевый бульон RVS, В.2), селективная обогатительная среда.

7.3.3 Дезоксихолатный ксилозо-лизиновый агар (агар XLD, В.3).

7.3.4 Вторая селективная среда в чашках для пересеянной культуры, выбор которой оставлен на усмотрение испытательной лаборатории. Точно следуют инструкциям изготовителя в отношении приготовления среды для применения.

7.3.5 Питательный агар (В.4), или другой подходящий неселективный агар.

7.3.6 Трехсахарный агар с железом (агар TSI, В.5).

В качестве альтернативы можно использовать двухсахарный агар с железом.

7.3.7 Агар с мочевиной, Кристенсена (Christensen) (В.6).

7.3.8 Среда для определения активности L-лизин-декарбоксилазы (В.7).

7.3.9 Селенит-цистиновый бульон (В.8).

7.3.10 Тетраонат-новобиоциновый бульон Мюллера-Кауфмана (МКТТн, В.9).

7.3.11 Вспомогательное вещество для фильтрации (В.10).

8 Проведение анализа

См. Рисунок А.1.

8.1 Подготовка проб

Для подготовки проб, фильтрации и посева на изолирующие среды необходимо следовать инструкциям, установленным в ISO 8199 и ISO 6887-1. Анализ начинают предпочтительно сразу же после отбора проб. Если пробы хранят при температуре окружающей среды, исследование начинают спустя 12 ч после отбора проб. В исключительных обстоятельствах допускается хранить пробы при температуре $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ в течение до 24 ч до анализа.

Объем анализируемой пробы зависит от типа воды. Обычно для воды из бассейнов и питьевой воды используют объемы от 1 000 мл до 5 000 мл. При анализе загрязненных поверхностных вод и сточных

вод обычно используют меньшие объемы.

Если требуется разведение пробы (например, сточных вод), готовят эти разведения в соответствии с ISO 8199.

8.2 Неселективное предварительное обогащение

8.2.1 Неселективное предварительное обогащение для объемов менее 10 мл

Засевают 50 мл BPW (B.1) при комнатной температуре пробой или разведениями пробы и инкубируют при температуре $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение (18 ± 2) ч.

8.2.2 Неселективное предварительное обогащение для объемов более 10 мл

Фильтруют объем воды, соответствующий типу анализируемой воды.

Погружают мембранный фильтр в 50 мл пептонной воды BPW (B.1).

Альтернативно добавляют пробу к такому же объему BPW двойной концентрации.

Необходимо отметить, что последняя процедура не годится для минеральной воды с высоким содержанием солей или для морской воды.

Инкубируют культуры при температуре $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение (18 ± 2) ч.

8.2.3 Рекомендации в отношении мутной или загрязненной воды

Для мутной или загрязненной воды можно добавить стерильное вспомогательное вещество для фильтрования (B.10) и фильтровать пробу через стерильную абсорбирующую прокладку, действующую как опорное основание вместо использования мембраны.

В этом случае фильтруют аликвотное количество вспомогательного вещества, обычно 15 мл, чтобы сформировать начальный слой абсорбирующей прокладки. Смешивают вторую аликвоту, обычно 15 мл, с объемом пробы и фильтруют. Для мутных или загрязненных вод можно профильтровать дополнительные аликвотные количества. По завершении фильтрования извлекают воронку и осторожно переносят абсорбирующую прокладку и вспомогательное вещество в пептонную воду BPW (B.1). Если необходимо, оставляют небольшой объем BPW, чтобы сполоснуть воронку и чтобы конечный объем BPW составил 100 мл. Инкубируют для определения присутствия или отсутствия, или дозируют на серии НВЧ для полуколичественного анализа.

8.3 Селективное обогащение

Доводят обогатительный бульон(ы) до равновесия с комнатной температурой, если их хранили при более низкой температуре. Переносят 0,1 мл культуры, полученной в 8.2, в пробирку, содержащую 10 мл бульона RVS (B.2). Если также используется МКТТп (B.9), переносят 1 мл культуры, полученной в 8.2, в пробирку, содержащую 10 мл бульона МКТТп.

Инкубируют засеянный бульон RVS при температуре $(41,5 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч и, если необходимо (см. 4.3), в течение (48 ± 4) ч. Необходимо следить за тем, чтобы максимальная