МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ ISO
7218—
2015**

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

(ISO 7218:2007, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии международного стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 18 июня 2015 г. № 47—2015)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 сентября 2015 г. № 1392-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 7218—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 7218:2007 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям» («Microbiology of foods and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations»), IDT, включая изменение Amd. 1:2013.

Международный стандарт разработан подкомитетом ISO/TC 34/SC 9 «Микробиология» Технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВЗАМЕН ГОСТ ISO 7218—2011

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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, 2016

В Российской Федерации 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 Помещения 2
3.1 Общие положения 2
3.2 Условия безопасности 3
3.3 Проектирование лаборатории 3
3.4 Участки лаборатории 3
3.5 Расположение и оснащение помещений 4
3.6 Чистка и дезинфекция 5
4 Требования к персоналу 5
4.1 Общие положения 5
4.2 Квалификация 5
4.3 Проверка квалификации персонала лаборатории 6
4.4 Гигиена 6
5 Аппаратура и оборудование 6
6 Подготовка стеклянной посуды и других лабораторных материалов 24
6.1 Подготовка 24
6.2 Стерилизация/деконтаминация 24
6.3 Одноразовое оборудование и материалы 24
6.4 Хранение чистой стеклянной посуды и других материалов 24
6.5 Обращение со стерильной стеклянной посудой и другими материалами 24
6.6 Применение деконтаминации и дезинфекции 25
6.7 Обработка отходов 25
6.8 Мойка 26
7 Приготовление и стерилизация питательных сред 26
8 Лабораторные пробы 26
8.1 Отбор проб 26
8.2 Транспортирование 26
8.3 Получение проб 27
8.4 Хранение 27
8.5 Проба (навеска) для исследования 27
9 Экспертиза (исследование 28
9.1 Гигиенические меры предосторожности при проведении исследований 28
9.2 Приготовление исходной суспензии и разведений 29
10 Подсчет 29
10.1 Общие положения 29
10.2 Подсчет при использовании плотных питательных сред 30
10.3 Расчеты и выражение результатов, полученных на плотных средах 32
10.4 Подсчет колоний дрожжей и плесеней 38
10.5 Подсчет при использовании жидких сред 38
11 Метод выявления (качественный метод) 44
11.1 Общие положения 44
11.2 Принцип 44
11.3 Измерение неопределенности 44
12 Метод идентификации (подтверждения) 45
12.1 Общие положения 45
12.2 Приготовление чистой культуры 45
12.3 Окрашивание по Граму (модифицированный метод Хакера) 45
12.4 Использование биохимических наборов для идентификации 46
12.5 Применение нуклеиновых зондов для идентификации 46
12.6 Серологические методы 47
13 Протокол испытаний 47
14 Валидация (обоснованность) микробиологических методов 48
14.1 Валидация (обоснованность) стандартных методов 48
14.2 Валидация (обоснованность) альтернативных методов 48
14.3 Валидация (обоснованность) собственных методов 48
15 Обеспечение качества результатов/контроля качества исполнения 48
15.1 Внутренний контроль качества 48

15.2 Эталонные штаммы 48
15.3 Внешний контроль качества (оценка качества сторонней организацией) 48
Приложение А (справочное) Свойства некоторых дезинфицирующих веществ 49
Приложение В (справочное) Доверительные интервалы для методики подсчета колоний 50
Приложение С (обязательное) Определение наиболее вероятного числа 54
Приложение D (обязательное) Подсчет колоний в случае двух чашек и одного разведения 61
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным межгосударственным стандартам 66
Библиография 67

Введение

При проведении микробиологических исследований особенно важным является следующее:

- необходимо выделять и подсчитывать только те микроорганизмы, которые присутствуют в пробах;

- следует исключить загрязнение окружающей среды микроорганизмами.

Чтобы достичь этого, необходимо уделять особое внимание личной гигиене и использовать рабочие методики, гарантирующие, насколько это возможно, исключение загрязнения извне.

При проведении микробиологических экспертиз является важным знание микробиологических методов и исследуемых микроорганизмов. Также важно, чтобы исследования проводились с максимальной аккуратностью, включая вопросы контроля и регистрации, которые могут влиять на результаты и вычисление количества микроорганизмов, а также вызывать сомнения в полученных результатах.

В конечном счете, ответственность лежит на руководителе лаборатории, который определяет, являются ли методические приемы безопасными и приемлемыми в рамках установившейся лабораторной практики.

Большое количество манипуляций может, например, непреднамеренно приводить к перекрестному загрязнению, и поэтому аналитику требуется всегда проверять точность результатов, полученных посредством методик, используемых в лаборатории.

Чтобы проводить экспертизы правильно, необходимо предпринимать определенные правила безопасности, касающиеся оснащения и оборудования лаборатории.

Необходимо предпринимать меры предосторожности не только по причине гигиены, но также и для того, чтобы гарантировать удовлетворительную воспроизводимость результатов. Невозможно предусмотреть все меры для всех возможных ситуаций, но настоящий стандарт, по меньшей мере, предусматривает основные правила приготовления, стерилизации, хранения питательных сред и использования соответствующего оборудования.

Следование правилам, изложенным в настоящем стандарте, поможет обеспечить безопасность персонала. Дополнительную информацию по этому вопросу можно найти в литературе, указанной в разделе «Библиография».

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

Microbiology of food and animal feed.
General requirements and guidance for microbiological examinations

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования и дает рекомендации/варианты по трем основным направлениям:

- внедрение стандартов Технического комитета ISO/TC 34/SC 9 или ТС 34/SC 5 по обнаружению и подсчету микроорганизмов, здесь и далее называемых соответствующими «стандартами на конкретный метод испытания»;
- надлежащая лабораторная практика для микробиологических лабораторий, исследующих пищевые продукты (в задачи настоящего стандарта не входит их описание, для этого имеются специальные справочники);
- руководство по аккредитации микробиологических лабораторий (в настоящем стандарте описываются технические требования согласно приложению В, [44] для аккредитации микробиологических лабораторий национальными органами).

Дополнительные требования по исследованиям в области молекулярной биологии приведены в ISO 22174.

Настоящий стандарт распространяется на исследования бактерий, дрожжей и плесеней. Допускается применение настоящего стандарта при исследованиях паразитов и вирусов при условии дополнения конкретными рекомендациями.

Настоящий стандарт не распространяется на исследования токсинов и других продуктов метаболизма микроорганизмов (например, аминов).

Настоящий стандарт применяется в микробиологии пищевых продуктов, кормов для животных, окружающей среды производства пищевых продуктов и производства сырья для пищевых продуктов.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения).

ISO 835, Laboratory glassware — Graduated pipettes (Посуда лабораторная стеклянная. Градуированные пипетки)

ISO 6887-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (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 6887-2:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила для приготовления мяса и мясных продуктов)

ISO 6887-3:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation

Издание официальное

of fish and fishery products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов)

ISO 6887-4:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для приготовления продуктов, кроме молока и молочных продуктов)

ISO 6887-5:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб для анализа, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологического исследования. Часть 5. Специальные правила подготовки молока и молочных продуктов)

ISO 8199:2005 Water quality — General guidance on the enumeration of microorganisms by culture (Качество воды. Общее руководство по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде)

ISO 8655-1:2002 Piston-operated volumetric apparatus — Part 1: Terminology, general requirements and user recommendations (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 1. Терминология, общие требования и рекомендации пользователю)

ISO 8655-2:2002 Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Piston pipettes (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 2. Пипетки, приводимые в действие поршнем)

ISO 8655-3:2002 Piston-operated volumetric apparatus — Part 3: Piston burettes (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 3. Бюретки, приводимые в действие поршнем)

ISO 8655-4:2002 Piston-operated volumetric apparatus — Part 4: Dilutors (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 4. Разбавители)

ISO 8655-5:2002 Piston-operated volumetric apparatus — Part 5: Dispensers (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 5. Раздаточные устройства)

ISO 8655-6:2002 Piston-operated volumetric apparatus — Part 6: Gravimetric methods for the determination of measurement error (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 6. Гравиметрические методы для определения ошибки измерения)

ISO 8655-7:2005 Pistonoperated volumetric apparatus — Part 7: Nongravimetric methods for the assessment of equipment performance (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 7. Негравиметрические методы для оценки рабочих характеристик оборудования)

ISO 11133, Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media (Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и проверка эксплуатационных характеристик питательных сред)

ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол проверки достоверности альтернативных методов)

ISO/TS 19036:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство для оценки неопределенности измерения количественных показателей)

ISO 22174:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions [Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Общие требования и определения]

3 Помещения

3.1 Общие положения

В данном разделе представлены общие требования и принципы планирования и организации при размещении микробиологической лаборатории.

Экспертизу проб на стадии производства пищевого сырья (особенно для приемки проб и стандартной подготовки проб) следует проводить отдельно от исследования других проб, чтобы уменьшить риск перекрестного загрязнения.

3.2 Условия безопасности

Проектирование лаборатории должно учитывать требования безопасности, которые будут зависеть от типа эпидемиологической опасности микроорганизма. По этому принципу микроорганизмы классифицируются на четыре категории риска:

- 1-я группа опасности (группа патогенности) (отсутствие риска или очень низкий риск для отдельного человека и общества).

Вероятность заражения таким микроорганизмом человека или животного мала.

- 2-я группа опасности (группа патогенности) (умеренный риск для отдельного человека, низкий риск для общества).

Это патоген, который может вызвать заболевание у человека или животного, но не представляющий серьезной угрозы для сотрудников лаборатории, общества или окружающей среды. Контакт с таким микроорганизмом в лаборатории может вызвать серьезную инфекцию у человека, но имеются способы эффективного лечения и профилактические меры, а риск распространения инфекции ограничен.

- 3-я группа опасности (группа патогенности) (высокий риск для индивидуума, низкий риск для общества).

Это патоген, который способен вызвать тяжелую болезнь у человека или животного, но обычно не распространяется от одного инфицированного индивидуума к другому. Существуют способы эффективного лечения и меры профилактики.

4-я группа опасности (группа патогенности) (высокий риск для индивидуума и для общества).

Это патоген, который обычно вызывает тяжелую болезнь у человека или животного и легко передается от больного к здоровому человеку или животному прямым контактом или с помощью другого механизма передачи возбудителя. Эффективных способов лечения и профилактических мер обычно не существует.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Группа опасности микроорганизма, распространенного в пределах конкретной страны, устанавливается соответствующими национальными нормативными документами.

3.3 Проектирование лаборатории

Рекомендации и правила по принципам обустройства лабораторий, описываемые ниже, применимы к исследованиям по выявлению микроорганизмов, относящихся к 1-й, 2-й и 3-й группам опасности в области микробиологии пищевых продуктов.

Следует принять во внимание, что в зависимости от конкретного национального законодательства может возникнуть необходимость в дополнительных мерах безопасности.

3.4 Участки лаборатории

3.4.1 Общие положения

Лаборатория включает отдельные участки, предназначенные для работы с пробами и их исследованием (см. 3.4.2) и общие помещения (см. 3.4.3). Они должны быть раздельными.

3.4.2 Участки, предназначенные для работы с пробами и их исследованием

Необходимо, чтобы лаборатория имела отдельные помещения или четко обозначенные зоны для следующих операций:

- приемки, регистрации и хранения проб;
- подготовки проб, особенно в случае сырья (например, порошкообразные продукты, содержащие высокое количество микроорганизмов);
- экспертизы проб (начиная от исходной суспензии), включая инкубацию (термостатирование) посевов;
- манипуляций с предполагаемыми патогенами;
- хранения контрольных и других штаммов;
- приготовления и стерилизации питательных сред и оборудования;
- хранения питательных сред и реактивов;
- экспертизы пищевых продуктов на стерильность;
- дезактивации (обеззараживания);
- подготовки стеклянной посуды и другого оборудования;
- хранения опасных химических веществ, предпочтительно в предназначенных для этого боксах, шкафах, отдельных комнатах или строениях.

3.4.3 Общие участки

Отдельно должны быть предусмотрены следующие участки:

- входы, коридоры, лестницы, лифты;
- административные помещения (например, комната для секретаря и офисные комнаты, комнаты для работы с документами и т. д.);
- раздевалки и туалеты;
- помещение для хранения архива;
- кладовые;
- комнаты отдыха.

3.5 Расположение и оснащение помещений

3.5.1 Цели

Цель состоит в том, чтобы условия окружающей среды, в которой проводят микробиологические исследования, не влияли на достоверность получаемых результатов исследований.

Помещения располагают таким образом, чтобы избежать риска перекрестного заражения. С этой целью необходимо соблюдать следующие положения:

a) организацию помещений лаборатории согласно принципу «нет пути назад», то есть без пересечения потоков;

b) выполнять процедуры последовательно, придерживаясь правил необходимой безопасности, чтобы гарантировать чистоту и целостность пробы (например, путем использования герметичных и опломбированных контейнеров);

c) разделять деятельность при выполнении различных этапов работы во времени и пространстве.

Необходимо избегать экстремальных ситуаций, таких как повышенная температура, запыленность, повышенная влажность, пар, шум, вибрация и т. д.

Помещения и площадь для лаборатории должны быть достаточными для поддержания чистоты и порядка в них. Помещения и площадь лаборатории должны быть соизмеримы с объемом проводимых исследований и общей внутренней организации лаборатории. Они должны соответствовать требованиям национальных инструкций или регламентов, если таковые существуют.

3.5.2 Оборудование помещений

Чтобы уменьшить риск загрязнения пылью и, следовательно, микроорганизмами (для 3-й группы опасности необходимо соблюдать национальные нормативные документы), помещения для проведения исследований должны быть построены и оборудованы следующим образом:

a) стены, потолки и поверхность пола должны быть гладкими, стойкими к моющим и дезинфицирующим средствам, используемым в лаборатории, легко мыться;

b) полы не должны быть скользкими;

c) верхние трубы, по которым проходит жидкость, не должны пересекать помещение, если они герметично не изолированы. Все другие навесные конструкции должны быть закрыты, но легко доступны при необходимости их периодической очистки;

d) при проведении исследований окна и двери должны быть закрытыми. Конструкция окон и дверей должна исключать возможность скопления пыли и облегчать их чистку. Окружающая температура (от 18 °С до 27 °С) и качество воздуха (содержание микроорганизмов, скорость распространения пыли и т. д.) должны удовлетворять условиям проведения исследований. Для этой цели рекомендуется использовать вентиляционную систему, оборудованную фильтрами для очистки поступающего в помещение воздуха и воздуха, удаляемого из помещения;

e) необходимо установить адекватную систему вытяжной вентиляции, чтобы предотвратить распыление при работе, возникающее при приготовлении дегидратированных питательных сред, пылеобразных и порошковых проб;

f) если исследования необходимо проводить в атмосфере с низким уровнем контаминации, комната должна быть специально оборудована чистым ламинарным шкафом с потоком воздуха и/или безопасным боксом;

g) если необходимо, помещения лаборатории должны быть защищены от вредных воздействий солнечной радиации с помощью ставней или специально обработанных стеклянных панелей. Не допускается устанавливать шторы или жалюзи изнутри, поскольку их трудно чистить, и они могут быть источником пыли.

3.5.3 Прочие условия

Необходимо также предусмотреть выполнение следующих условий:

- подведение воды надлежащего качества для использования;
- наличие электрического питания;

- подведение газа (по трубам — централизованного или в баллонах);
- достаточное освещение в каждой зоне лаборатории;
- поверхности лабораторного инвентаря и мебели должны быть изготовлены из гладкого, непроницаемого материала, который легко мыть и дезинфицировать;
- лабораторная мебель должна быть разработана таким образом, чтобы облегчить ее обработку (например, передвижная мебель);
- в помещениях, где проводят исследования проб, не должны находиться мебель, документация и другие вещи, которые не применяют при проведении исследования;
- документацию, используемую в работе с пробами, питательными средами, реактивами и т. п. необходимо хранить в закрытых шкафах или ящиках столов;
- в каждой комнате, где проводят исследования, необходимо установить раковины для мытья рук и, если необходимо, в других участках, предпочтительно около двери;
- наличие автоклава для обеззараживания зараженных отработанных материалов и использованных питательных сред, если нет специальной системы для удаления зараженных отходов для сжигания на месте;
- обеспечение защитными системами для борьбы с огнем (огнетушители, ведра и т. д.), системой аварийного электропитания, аварийного обеспечения водой для душа и промывания глаз;
- обеспечение средствами для оказания первой помощи.

3.6 Чистка и дезинфекция

Необходимо соблюдение следующих аспектов:

a) полы, стены, потолки, поверхности лабораторных столов, мебель следует содержать в чистоте и ремонтировать, чтобы избежать образования трещин, которые могут быть источником загрязнения;

b) чтобы содержать помещение в состоянии, пригодном для проведения исследований, уборку и дезинфекцию следует выполнять постоянно. Загрязненные или потенциально зараженные поверхности следует дезактивировать, для чего необходимо использовать дезинфицирующие средства, обладающие способностью уничтожать бактерии и грибы.

Примечание — Комнаты и оборудование могут быть дезактивированы окуриванием парами формальдегида, если это допускается национальными нормативными документами.

c) системы вентиляции и их фильтры следует регулярно проверять, при необходимости, с заменой фильтров на новые;

d) микробиологическое состояние рабочих поверхностей лаборатории, поверхностей, с которыми соприкасается персонал, а также воздух необходимо регулярно проверять (частота проверок зависит от результатов предыдущих исследований);

e) загрязненность поверхностей следует оценивать наложением на них пластин, содержащих соединения, способные нейтрализовать дезинфицирующие вещества (например, лецитин, тиосульфат натрия). Качество воздуха может быть исследовано при экспозиции открытой чашки Петри в течение 15 мин, содержащей неселективную агаровую питательную среду [например, среду для подсчета колоний — мясопептонный агар — МПФ-РСА (plate count agar)] или селективную агаровую среду, используемую для выявления искомых микроорганизмов (например, плесеней).

Примечание — Могут также использоваться другие методы для оценки загрязнения поверхностей и воздуха. См. [47]

4 Требования к персоналу

4.1 Общие положения

Общие требования к квалификации персонала изложены в [44].

4.2 Квалификация

Как при приеме на работу сотрудников, так и для уже работающих в лаборатории необходимо установить объективные критерии оценки соответствующей квалификации по владению необходимыми методами или техническими приемами.

Квалификация может быть установлена в пределах лаборатории с помощью внутреннего кон-

троля качества (см. 15.1.2).

Примечание — Одна из причин некачественного выполнения работы (пипетирование, недостаточная гомогенность первичной суспензии, подсчет и т.д.) в случае учета числа колоний описана в [41].

4.3 Проверка квалификации персонала лаборатории

Проверку квалификации работающего персонала в лаборатории необходимо проводить регулярно, основываясь на объективных параметрах. Она включает участие в программах по внутреннему контролю качества, проверку квалификации (см. ISO 43-1), использование стандартных образцов или проверку по тестам самооценки при подсчете микроорганизмов, как описано в [42].

4.4 Гигиена

В лаборатории следует соблюдать следующие меры личной гигиены, чтобы избежать загрязнения проб и питательных сред, а также избежать риска инфицирования персонала:

a) Лабораторная одежда должна быть застегнутой надлежащим способом, чистой, в хорошем состоянии, изготовленной из ткани, ограничивающей риск воспламенения. Эту одежду не следует носить вне рабочей зоны и, в частности, в ней нельзя выходить в туалет.

b) На волосяной покров головы и лица следует надеть защитные повязки.

c) Ногти следует содержать в чистоте и желательно короткими.

d) Необходимо мыть руки в теплой воде из нерегулируемого вручную крана до и после микробиологических исследований, а также после посещения туалета. Рекомендуется использовать жидкое или порошковое мыло, или другое дезинфицирующее средство, поступающее из дозатора, поддерживаемого в чистом состоянии. Для сушки рук следует использовать одноразовые бумажные или матерчатые салфетки или полотенца. Эти предосторожности относятся как к персоналу лаборатории, так и посетителям.

e) При работе с открытыми пробами, питательными средами и при посеве материала не допускается разговаривать, кашлять и т. д.

f) Люди, имеющие инфекционные заболевания кожи или страдающие заболеваниями кожи, должны предпринимать меры предосторожности, если микроорганизмы от них способны инфицировать пробы, что может отразиться на результатах исследований.

g) В лаборатории нельзя принимать пищу, пить, оставлять пищевые продукты для личного потребления в лабораторных холодильниках или морозильных камерах.

h) Недопустимо осуществлять пипетирование ртом.

5 Аппаратура и оборудование

5.1 Общие положения

В соответствии с установившейся лабораторной практикой всю аппаратуру и оборудование содержат в чистоте и в хорошем рабочем состоянии. Перед использованием оборудование следует проверить на пригодность для соответствующих целей. В процессе работы оборудование периодически проверяют по определенным характеристикам, когда это целесообразно.

При необходимости оборудование и контрольно-измерительные приборы калибруют в соответствии с действующими национальными стандартами. Выполняют также повторную калибровку и необходимые промежуточные поверки, а проведенные процедуры, результаты калибровок и проверок документируют.

Оборудование регулярно проверяют и проводят сервисное обслуживание, чтобы обеспечить безопасность и пригодность его к использованию. Оборудование проверяют согласно рабочим условиям и точности, требуемой для получения результатов.

Частота калибровки и проверок каждой единицы оборудования в большинстве случаев не установлена в настоящем стандарте, поскольку должна определяться каждой лабораторией в зависимости от типа оборудования и уровня активности лаборатории и в соответствии с инструкциями изготовителя оборудования. В ограниченном числе случаев частота калибровок и проверок устанавливается, поскольку это необходимо для эффективной деятельности лаборатории.

Аппаратуру и оборудование следует сконструировать и установить таким образом, чтобы облегчить работу персоналу и обеспечить выполнение технического обслуживания, очистки, дезактивации и калибровки.

Все неопределенности измерений, приведенные в данном разделе, связаны с рассматривае-

мой здесь аппаратурой и оборудованием, но не с методом исследования в целом.

В этом разделе установлены требования, предъявляемые к точности измерительного оборудования. Они основаны на практической допустимости отклонений, позволяющей гарантировать надлежащий контроль оборудования в процессе обычной рабочей деятельности. Установленная точность связана с метрологической неопределенностью прибора (см. ISO/IEC Руководство 99).

У приборов, контролирующих температуру, следует проверить стабильность и равномерность распределения температуры перед началом использования и после любого ремонта или их модификации, которые могут влиять на достоверность температурного контроля.

5.2 Бокс биологической безопасности для микробиологических исследований

5.2.1 Описание

Бокс биологической безопасности для микробиологических исследований — это рабочее помещение, оснащенное установкой для горизонтального и вертикального ламинарных потоков воздуха, предназначенной для удаления пыли и других частиц из воздуха, в том числе микроорганизмов.

Максимально допустимое количество частиц в кубическом метре с размером не менее или равным 0,5 мкм представляет класс устранения пыли из защитного бокса с очисткой воздуха. Для боксов, используемых в микробиологии пищевых продуктов, количество частиц должно быть не более 4000 в кубическом метре.

Боксы для использования в лабораториях микробиологии пищевых продуктов подразделяют на четыре типа.

a) Боксы биологической безопасности класса I — это открытые с лицевой стороны безопасные вытяжные шкафы, защищающие оператора и окружающую среду, но не защищающие продукт от загрязнения извне. Потенциально инфицированные аэрозоли будут циркулировать внутри бокса и затем поглощаться фильтром. Отфильтрованный воздух затем поступает в атмосферу; если этого не происходит, воздух должен пройти через два сухих воздушных фильтра (HEPA), установленных последовательно. Данный тип боксов не допускается для работы с микроорганизмами 3-й группы патогенности из-за трудностей в поддержании и обеспечении соответствующей безопасности оператора.

b) Боксы биологической безопасности класса II защищают продукт, оператора и окружающую среду. В них профильтрованный воздух циркулирует, а часть выделяется в атмосферу и заменяется воздухом через рабочее отверстие. Таким образом, обеспечивается защита оператора. Эти боксы подходят для работы с микроорганизмами 2-й и 3-й групп патогенности.

c) Ламинарные боксы с горизонтальным оттоком воздуха защищают рабочее место от загрязнения, но выносят любые аэрозоли на лицо оператора. Поэтому они не могут использоваться для работы с инокулируемыми культурами или для приготовления культуры ткани.

d) Ламинарные боксы с вертикальным потоком воздуха защищают продукт при помощи вертикального ламинарного потока воздуха, профильтрованного через фильтр HEPA. Они также защищают оператора при помощи использования внутреннего рециркулированного воздуха. Они особенно подходят для обеспечения стерильной окружающей среды при работе со стерильными продуктами и для защиты оператора при работе с порошками.

Если это определено национальными регламентами, боксы биологической безопасности используют для любых видов работы с патогенными микроорганизмами и контаминированными порошками.

В боксах биологической безопасности не допускается использовать газовые горелки или прокаливатели проволоки. В случае необходимости газовую горелку применяют при условии создания маленького пламени, таким образом, чтобы не нарушить поток воздуха. Приемлемой альтернативой является использование одноразового оборудования (бактериологических петель, пипеток и т.д.)

5.2.2 Использование

В лабораториях используют боксы биологической безопасности, которые пригодны для конкретного исследования и с учетом условий окружающей среды.

Боксы не должны загромождаться оборудованием.

Все необходимое размещают до начала работы внутри бокса, чтобы свести к минимуму количество движений рук внутри и вне рабочей зоны. Расположение оборудования и материалов должно быть таким, чтобы свести к минимуму нарушение потока воздуха в рабочей зоне.

Операторы должны быть обучены правильному использованию боксов, чтобы обеспечивать как их безопасность, так и сохранность пробы или культуры микроорганизмов.

5.2.3 Очистка и дезинфекция

Рабочую зону очищают и обеззараживают после использования с помощью соответствующего, не обладающего коррозийными свойствами, дезинфицирующего средства, руководствуясь инструкцией изготовителя. Регулярно обследуют защитные предфильтры проволочных сеток и вытирают их

чистой, пропитанной дезинфицирующим средством, тканью.

Для ламинарных шкафов с очисткой воздуха наружную часть фильтра необходимо регулярно очищать под вакуумом таким образом, чтобы не повредить фильтрующий элемент.

Боксы биологической безопасности следует дезинфицировать перед заменой фильтра или плановым обслуживанием.

После очистки бокса для обеззараживания можно использовать ультрафиолетовые (УФ) лампы. УФ лампы регулярно очищают или заменяют в соответствии с инструкциями изготовителя. При их использовании они подлежат регулярной очистке с целью удаления пыли и грязи, которые могут повлиять на бактерицидную эффективность ультрафиолетового света. Необходимо проверять интенсивность ультрафиолетового излучения в процессе повторной сертификации бокса, чтобы гарантировать соответствие светового излучения лампы инструкциям изготовителя.

См. [17].

5.2.4 Техническое обслуживание и контроль

Квалифицированный оператор должен проверять эффективность бокса биологической безопасности при получении и затем с регулярными интервалами, как рекомендует изготовитель, а также после любого ремонта или модификации. Эффективность проверяют после перемещения бокса.

Следует периодически выполнять проверку чистоты рабочей поверхности и стен бокса от любого микробиологического загрязнения.

Необходимо периодически осуществлять проверку числа микроорганизмов, циркулирующих в воздухе во время работы фильтров, с помощью обычного оборудования. Например, экспонируя несколько открытых чашек Петри, содержащих неселективную агаровую культуральную среду (например, агара для подсчета микроорганизмов), в каждом боксе в течение 30 мин. Допускается использовать другие методы.

5.3 Весы и гравиметрические разбавители

5.3.1 Использование и неопределенность измерения

Весы используют преимущественно для взвешивания испытуемой пробы, компонентов питательных сред и реактивов. Кроме того, весы допускается использовать для измерений объемов разведенной жидкости с помощью определения массы.

Гравиметрические разбавители – это электронные инструменты, состоящие из весов и программируемого дозатора жидкости, который применяют для приготовления исходных суспензий проб. В их функции входит добавление разбавителя к первичной пробе в определенном отношении. Пробу взвешивают в установленных пределах допустимости для данного применения, далее добавляют разбавитель для получения определенного объема, чтобы получить достаточное разведение для требуемого отношения (например, 9:1 для десятикратных разведений). См. ISO 6887-1.

Лаборатория микробиологии пищевых продуктов должна быть оборудована весами требуемого диапазона с требуемой неопределенностью для взвешивания различных продуктов.

Если нет других указаний, разрешающая способность весов должна быть не более 1 %, чтобы обеспечить максимальную допустимую погрешность 5 % по массе.

Примеры

Для взвешивания 10 г весы должны обеспечить считывание до 0,1 г.

Для взвешивания 1 г весы должны обеспечить считывание до 0,01 г.

Оборудование устанавливают на устойчивую горизонтальную поверхность с защитой от вибраций и сквозняков.

5.3.2 Очистка и обеззараживание

Оборудование очищают и дезинфицируют после каждого использования или после проливания (рассыпания) при взвешивании с помощью подходящего некоррозирующего дезинфицирующего средства.

5.3.3 Проверка показателей и калибровка

5.3.3.1 Калибровка

Обученный оператор должен проверять калибровку по всему диапазону, частота проверки зависит от интенсивности использования.

5.3.3.2 Проверка

Обученный оператор должен регулярно проверять рабочие характеристики системы взвешивания во время использования и после очистки с помощью контрольных разновесов.

Примечание — Контрольные разновесы могут быть проверены также непосредственно после калибровки весов.

5.4 Гомогенизаторы, смесители и миксеры

5.4.1 Описание

Данное оборудование используют для получения исходной суспензии из испытуемой пробы.

Допускается использовать следующую аппаратуру:

- перистальтический смеситель со стерильными пакетами, возможно с устройством для регулирования скорости и таймером;

Примечание — *Stomacher®* — пример подходящей продукции, имеющейся в продаже. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не налагает обязательств со стороны ISO применять данную продукцию.

- ротационный гомогенизатор (блендер), способный создавать скорость от 8000 до 45000 об/мин включительно, со стерилизуемыми стеклянными или металлическими флаконами, закрываемыми крышками;
- вибрационный миксер (вибратор) со стерильными пакетами; или

Примечание — *Pulsifier®* — пример подходящей продукции, имеющейся в продаже. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не налагает обязательств со стороны ISO применять данную продукцию.

- другая система гомогенизации эквивалентной эффективности.

В некоторых случаях перемешивание может быть выполнено вручную с использованием стерильных стеклянных бус, имеющих соответствующий диаметр (приблизительно 6 мм; см. ISO 6887-2 и ISO 6887-5).

5.4.2 Применение

Обычно рабочее время гомогенизатора перистальтического типа составляет от 1 до 3 мин (см. ISO 6887-2 и ISO 6887-5 для конкретных пищевых продуктов).

Для некоторых видов пищевых продуктов эту аппаратуру использовать нельзя, а именно для продуктов:

- способных проколоть пакет (наличие острых, твердых или сухих частиц);
- которые трудно гомогенизировать из-за их структуры (например, колбаса типа салями).

Ротационный гомогенизатор должен использоваться в таком режиме, чтобы общее количество оборотов составляло от 15000 до 20000 об/мин включительно. Даже при использовании минимального числа оборотов продолжительность работы не должна превышать 2,5 мин.

Вибрационный миксер можно использовать для большинства пищевых продуктов, включая твердые или сухие изделия. Обычное время работы составляет от 30 до 60 с. Если микроорганизмы расположены глубоко внутри клейкой структуры продукта, пробу перед обработкой следует разрезать на маленькие кусочки.

Стеклянные бусы применяют для подготовки исходных суспензий контролируемых вязких или густых продуктов, в частности, молочных продуктов (см. соответствующие стандарты на конкретные методы испытаний).

5.4.3 Очистка и обеззараживание

Перистальтические гомогенизаторы и вибрационные миксеры моют и обеззараживают после каждого применения, а также после любого разрыва пакета или протекания.

Ротационные гомогенизаторы моют и стерилизуют после каждого применения.

5.4.4 Техническое обслуживание

Контроль и техническое обслуживание оборудования — в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.5 pH-метр

5.5.1 Описание

pH-метр применяют для измерения при определенной температуре разности потенциалов между измеряющим электродом и электродом сравнения, погруженными в продукт. pH-метр должен обеспечивать считывание показаний до ± 0,01 ед. pH, а погрешность измерений должна составлять 0,1 ед. pH. Он должен быть оснащен ручным или автоматическим определителем температуры.

Примечание — Измерительный электрод и электрод сравнения обычно соединяют в одну систему электродов.

5.5.2 Использование pH-метра

pH-метр используют для измерения значения pH питательных сред и реактивов с целью проверки, требуется ли регулирование значения в процессе приготовления, а также для проверки их качества после стерилизации.

Прибор может также использоваться для измерения значений pH проб и суспензий проб. Использование pH-метра предусматривают в стандарте на конкретный анализируемый продукт, в котором определены условия для измерения значения pH и условия получения нужного значения pH.

pH-метр регулируют в соответствии с инструкцией изготовителя для измерения значения pH при стандартизированной температуре, например, 25 °С. Значение pH считывают после того, как стабилизируется показание. Значение pH записывают с точностью до двух знаков после запятой.

Примечание — Показание можно считать стабильным, когда значение pH, измеренное в течение 5 с, изменяется не более чем на 0,02 ед. pH. При использовании электродов в хорошем состоянии равновесие обычно достигается в пределах 30 с.

5.5.3 Калибровка и проверка

5.5.3.1 Калибровка

pH-метр проверяют в соответствии с инструкцией изготовителя, используя не менее двух, а лучше трех стандартных буферных растворов, по меньшей мере один раз в день перед началом работы. При этой проверке определяют максимально допустимые погрешности, которые должны быть более строгими, чем погрешность, допустимая при обычном использовании.

Буферные растворы должны быть прослеживаемыми и иметь значения pH, определяемые с точностью до двух знаков после запятой при температуре измерения (как правило, pH 7,00, pH 4,00 и/или pH 9,0 при 25 °С, в соответствии с инструкцией изготовителя). Измеряемое значение pH должно находиться между значениями pH стандартных растворов.

5.5.3.2 Проверка

После калибровки pH-метра с двумя определенными стандартными буферными растворами pH необходимо проверить возможность считывания (в режиме считывания), используя третий буферный раствор, чтобы убедиться в исправности pH-метра.

Если при проверке устанавливается, что результат находится за пределами максимально допустимой ошибки, выполняют регулировку pH-метра в соответствии с инструкцией изготовителя. После регулировки следует провести дальнейшую калибровку и проверку.

5.5.4 Обслуживание

Электроды проверяют и поддерживают в соответствии с инструкцией изготовителя. Необходимо, в частности, регулярно проверять:

- состояние электродов с учетом их старения и загрязнения,
- характеристики, относящиеся к времени ответа при измерении и к стабильности измеряемых показателей.

Электроды необходимо ополаскивать дистиллированной или деионизированной водой после каждого использования. Учитывая загрязнение и старение электродов, их регулярно тщательно чистят в соответствии с инструкцией изготовителя.

Электроды хранят в соответствии с инструкцией изготовителя.

5.6 Автоклав

5.6.1 Описание

Автоклав позволяет поддерживать в камере температуру насыщенного пара.

Автоклав должен быть оснащен:

- как минимум, одним предохранительным клапаном,
- сливным краном,
- регулятором температуры для поддержания необходимой температуры в камере в пределах ± 3 °С (с учетом неопределенности измерения, связанной с измерительной термопарой),
- температурным датчиком или регистрирующим термоэлементом.

Автоклав должен также быть оснащен таймером и устройством для записи температуры.

5.6.2 Использование

При стерилизации водяным паром воздух перед автоклавированием удаляется с помощью увеличения давления. Если автоклав не снабжен автоматическим устройством удаления воздуха, его необходимо вытеснить, пока не начнет выходить непрерывная струя пара.

С целью достижения стерилизации питательных сред насыщенный пар в камере должен иметь температуру не менее (121 ± 3) °С или температуру, установленную инструкцией изготовителя, ин-

струкцией на продукцию либо установленную в методе испытания.

Для уничтожения (разрушения) микроорганизмов и деконтаминации используемых питательных сред насыщенный пар в камере должен иметь температуру не менее (121 ± 3) °С.

В течение одного и того же цикла стерилизации нельзя использовать автоклав для стерилизации чистого оборудования (и/или питательных сред) и одновременно обеззараживать использованное оборудование (и/или использованные питательные среды).

Для осуществления двух данных процессов предпочтительно использовать отдельные автоклавы. После автоклавирования все материалы и оборудование необходимо охладить в автоклаве перед их извлечением.

В целях безопасности нельзя извлекать содержимое из автоклава, пока температура не снизится приблизительно до 80 °С.

5.6.3 Обслуживание

Регулярно моют камеру, сушат фильтр и уплотнители дверцы. Проверяют уплотнители дверцы на целостность. Через определенные интервалы и по мере необходимости выполняют операции по высушиванию и удалению накипи в соответствии с рекомендациями изготовителя.

5.6.4 Проверка и калибровка

Автоклав необходимо содержать в хорошем эксплуатационном режиме и регулярно проверять компетентным квалифицированным персоналом в соответствии с инструкциями изготовителя.

Контрольно-измерительные приборы необходимо поддерживать в порядке и готовности к работе, калибровать их и регулярно проверять.

Начальная проверка должна включать в себя испытание рабочих показателей для каждого операционного цикла и каждой используемой в практической работе конфигурации загрузки. Этот процесс необходимо повторять после существенного ремонта или модификации прибора. При проверке устанавливают достаточное количество датчиков температуры, чтобы установить надлежащее поступление тепла во все рабочие зоны прибора. При проверке и перепроверке необходимо установить продолжительность как времени нагревания, так и периода охлаждения, а также температуру стерилизации.

Там, где отсутствует прослеживаемая эффективность автоклавирования, необходимо как минимум при каждой загрузке в середину автоклава поместить индикатор автоклавирования для проверки процесса нагревания.

5.7 Аппарат для приготовления питательных сред

5.7.1 Описание

Аппарат для приготовления питательных сред разработан для стерилизации больших объемов сред (более 1 дм^3). Он состоит из нагревающегося сосуда, водяной рубашки и устройства непрерывного перемешивания. Указанное оборудование должно быть оснащено термометром, манометром, таймером и предохранительным клапаном.

Кроме того, прибор должен иметь замок-предохранитель, чтобы предотвратить открывание, пока температура не достигнет значения чуть менее 80 °С.

5.7.2 Использование

Необходимо всегда следовать инструкциям изготовителя.

Весь процесс приготовления питательных сред происходит внутри аппарата. После добавления всех компонентов они растворяются посредством размешивания и нагревания. Затем происходит стерилизация.

5.7.3 Обслуживание

Аппарат моют и полностью ополаскивают чистой водой после каждой партии сред.

5.7.4 Проверка

Аппарат для приготовления питательных сред содержат в хорошем рабочем состоянии, регулярно проверяют компетентным квалифицированным персоналом в соответствии с инструкциями изготовителя.

Контрольно-измерительные приборы необходимо поддерживать в порядке и готовности к работе, калибровать их и регулярно проверять.

Начальная проверка должна включать в себя изучение рабочих показателей для каждого операционного цикла и каждого объема загрузки, используемого в практике. Этот процесс необходимо повторить после существенного ремонта или модификации. Для демонстрации однородности нагревания следует установить два датчика температуры: один — примыкающий к контрольной пробе, а другой — отдаленный от нее.

Необходимо проверять температуру и продолжительность каждого цикла.

5.8 Термостат (инкубатор)

5.8.1 Описание

Термостат состоит из изолированной камеры, которая позволяет удерживать постоянство температуры, равномерно распределенной в камере в пределах максимально допустимой температурной ошибки, указанной в методе испытания.

5.8.2 Использование

Термостаты должны быть оборудованы системой регулирования, которая позволяет сохранять температуру или другие параметры равномерными и постоянными по полному рабочему объему камеры. Чтобы это условие выполнялось, определяют рабочий объем термостата.

Если окружающая температура близка или выше температуры в термостате, необходимо использовать систему охлаждения камеры.

Стенки термостата должны быть защищены от солнечного света.

Термостаты по возможности не следует заполнять полностью ни в одном операционном цикле, поскольку питательные среды будут отнимать значительно большее время для достижения постоянства необходимой температуры независимо от типа используемого инкубатора (с принудительной воздушной вентиляцией или другого типа). Нельзя оставлять дверцы термостата открытыми в течение длительного периода времени.

При загрузке термостатов необходимо проследить за циркуляцией воздуха (см. 10.2.5).

5.8.3 Очистка и санитарная обработка

Регулярно очищают и проводят санитарную обработку внешних и внутренних стенок термостата и, если необходимо, удаляют пыль из системы вентиляции.

5.8.4 Проверка

Проверяют стабильность температуры и однородность распределения температуры в рабочем объеме камеры термостата с помощью одновременного использования нескольких термометров или термоэлементов известной точности в необходимом диапазоне температуры.

Полученную информацию используют для определения приемлемого операционного диапазона термостата и оптимального местоположения термометра или регистрирующей термопары для контроля рабочих температур.

Например, чтобы достигнуть необходимой температуры (37 ± 1) °С при данных контроля, который показывает диапазон 36,8 °С — 37,3 °С в разных частях рабочего объема термостата, рабочий диапазон необходимо уменьшить до 36,2 °С — 37,7 °С, чтобы обеспечить во всех частях термостата требуемую температуру 37 °С.

Этот процесс требуется повторять после каждого существенного ремонта или модификации термостата.

Температуру в процессе работы необходимо проверять с помощью одного или нескольких термометров с выявлением максимальной и минимальной границ диапазона или, например, с помощью записывающих термопар.

Температуру термостата проверяют, по меньшей мере, каждый рабочий день. С этой целью каждый термостат должен включать не менее одного термометра, шарик которого погружен в глицерин (или в другую подходящую теплопоглощающую жидкость). Можно использовать другие системы проверки работы с равноценными характеристиками.

5.9 Холодильник, холодная комната (помещение для хранения на холоде)

5.9.1 Описание

Холодильники представляют собой камеры, которые позволяют хранить при пониженной температуре. Для хранения проб пищевых продуктов температура должна быть (3 ± 2) °С (максимальные допустимые отклонения), за исключением специальных случаев использования. Для других вариантов использования температура, если не установлено иначе, должна быть (5 ± 3) °С.

5.9.2 Использование

Чтобы избежать перекрестного загрязнения, используют разные камеры, или, по крайней мере, различные контейнеры, достигая тем самым физического разделения, для хранения следующих продуктов:

- незасеянных питательных сред и реактивов;
- проб для исследований;
- культур микроорганизмов и инкубированных питательных сред.

Загрузку холодильников, холодильных камер и холодных комнат проводят таким образом, чтобы поддерживалась необходимая циркуляция воздуха и возможность перекрестного заражения была сведена к минимуму.

5.9.3 Проверка

Температуру каждой камеры проверяют ежедневно, используя термометр или постоянно установленный датчик. Точность, требуемая для контролирующего температуру устройства, зависит от цели, с которой эта камера используется.

5.9.4 Обслуживание и очистка

Выполняют следующие профилактические операции с постоянными интервалами, чтобы обеспечить надлежащую работу оборудования:

- удаление пыли с лопастей мотора или с внешних пластин термообменника;
- размораживание;
- мытье и санитарную обработку внутренней части камеры.

5.10 Морозильная камера и установка для глубокого замораживания

5.10.1 Описание

Морозильная камера — это аппарат, который гарантирует хранение в условиях замораживания. Температура, кроме особо оговоренных случаев, должна быть не более минус 15 °С, предпочтительно не более минус 18 °С для проб пищевых продуктов.

Установка для глубокого замораживания — это камера, которая гарантирует хранение глубокозамороженного продукта. Температура, если не указано иначе, должна быть не более минус 70 °С.

5.10.2 Использование

5.10.2.1 Морозильная камера

Необходимо иметь разные камеры или, по меньшей мере, разные контейнеры, чтобы обеспечить физическое разделение при хранении:

- неинокулированных реактивов;
- проб для анализа; и
- культур микроорганизмов.

Морозильные камеры заполняют таким способом, чтобы поддерживалась достаточно низкая температура, особенно в случаях, когда в них загружают незамороженные продукты.

5.10.2.2 Установка для глубокого замораживания

Морозильные камеры применяют для хранения микроорганизмов, контрольных и/или рабочих культур и реагентов.

Их загружают таким способом, чтобы поддерживалась низкая температура и не допускалось взаимное загрязнение между микроорганизмами и реагентами.

5.10.3 Проверка

Регулярно проверяют температуру каждой камеры, используя подходящие устройства, контролирующие температуру.

5.10.4 Техническое обслуживание

Регулярно выполняют следующие операции для поддержания морозильных камер в рабочем состоянии:

- удаление пыли с лопастей мотора и с внешних пластин термообменника (если возможно);
- размораживание;
- мытье и санитарную обработку внутренней части камеры.

5.11 Баня термостатическая контролируемая

5.11.1 Описание

Баня с терморегулятором, заполненная жидкостью (вода, этиленгликоль и т. д.), с подогнанной крышкой или без нее или другим устройством, ограничивающим испарение, требуется для поддержания необходимой температуры. Контроль температуры часто более точен, чем в воздушном термостате, и обеспечивает максимально допустимое отклонение ± 0,5 °С или менее. Рабочие температуры и требуемые максимально допустимые погрешности устанавливают для каждого отдельного метода или контрольного метода. Для поддержания температуры, близкой к окружающей температуре или ниже данной температуры, необходима система охлаждения.

5.11.2 Использование

В основном баню используют для решения следующих задач:

- инкубации при постоянной температуре засеянных питательных сред;
- поддержания стерильных расплавленных агаровых сред при приготовлении сред;
- термообработки стерильных расплавленных агаровых сред для использования в определенных методах;
- приготовления первичных суспензий проб или растворов при контролируемой температуре;

- обработки нагреванием первичных суспензий проб при контролируемой температуре (например, пастеризация).

Там, где требуется точный контроль температуры, баня должна быть оборудована циркуляционным водяным насосом и автоматической системой регулирования температуры. Любое перемешивание жидкости не должно приводить к разбрызгиванию капель.

Для использования при точной или высокой температуре предпочтительны бани с крышками. Следует использовать покатые крышки, создающие условия для стока конденсата.

Для инкубации засеянных питательных сред жидкость в бане поддерживают на уровне, чтобы верхний край питательной среды был на 2 см ниже уровня жидкости в бане в течение времени инкубации.

Другие контейнеры необходимо размещать в бане таким образом, чтобы уровень их содержимого был ниже уровня жидкости.

Глубина погружения должна препятствовать попаданию воды через крышку.

Допускается применять устройства для поддержания контейнеров в стабильном положении, например, штативы.

После выемки из бани все контейнеры должны быть высушены перед дальнейшим использованием.

5.11.3 Проверка

Проверке подлежат стабильность и однородность температуры во всех частях бани перед началом использования и после любого ремонта или модификаций, оказывающих влияние на контроль температуры.

Контроль температуры в бане осуществляют с помощью термометра, термоэлементов или устройства регистрации температуры с подходящей минимальной неопределенностью измерения (см. 5.28.2) и независимо от автоматической системы регуляции температуры.

Примечание — Допускается также использовать цифровой дисплей при условии, что его точность и разрешение проверены на соответствие требованиям.

Температуру бани контролируют в течение каждого использования и, как минимум, ежедневно при продолжительной инкубации.

5.11.4 Обслуживание

Баню перед началом работы необходимо заполнить жидкостью, как рекомендуется изготовителем. Для инкубации культур предпочтительно следует использовать дистиллированную или деионизированную воду.

Регулярно проверяют уровень жидкости, чтобы обеспечить правильное функционирование бани и надлежащее погружение помещенных в нее проб. Уровень жидкости должен всегда закрывать нагревательные элементы.

Следует регулярно выливать жидкость из бани, очищать, санировать и снова заполнять баню жидкостью, в зависимости от частоты использования, а также после того, когда происходит разбрызгивание или протекание бани.

5.12 Пароварки, включая бани с кипящей водой

5.12.1 Описание

Пароварки и бани с кипящей водой состоят из нагревательного элемента, окруженного водой в сосуде с плотно подогнанной крышкой. В пароварке при атмосферном давлении образуется пар; в бане с кипящей водой нагревается вода до температуры кипения или близкой к таковой с образованием или без образования пара.

5.12.2 Использование

Данное оборудование используют, главным образом, для следующего:

- расплавления агаризованных питательных сред;
- приготовления неустойчивых к повышенной температуре сред;
- уменьшения зараженности мелких компонентов оборудования между использованием.

В сосуде должен быть достаточный уровень воды, чтобы обеспечить полное постоянное погружение нагревательных элементов.

Можно использовать автоклав с автономной парообразующей способностью.

5.12.3 Обслуживание

Пароварки и бани с кипящей водой необходимо содержать в чистоте.

При необходимости следует чистить приборы от накипи с частотой, зависящей от жесткости местной воды.

5.13 Стерилизационный сушильный шкаф

5.13.1 Описание

Стерилизационный сушильный шкаф — это камера, которая способна поддерживать температуру от 160 °С до 180 °С для уничтожения (разрушения) микроорганизмов с помощью сухого горячего воздуха.

5.13.2 Использование

В стерилизационном сушильном шкафу следует стерилизовать только прочное и твердое оборудование, такое как стеклянная посуда и металлические изделия.

Перед стерилизацией стеклянной посуды и металлических инструментов их очищают и моют.

При стерилизации мерной стеклянной посуды ее регулярно проверяют на точность маркированных объемов.

Температура в стерилизационном сушильном шкафу должна быть одинаковой во всех частях камеры. Сушильный шкаф должен быть оснащен термостатом и термометром или устройством регистрации температуры, соответствующей точности.

Сушильный шкаф должен быть оборудован индикатором продолжительности работы, программируемым устройством или таймером.

После достижения температуры стерилизации процедура стерилизации должна длиться не менее одного часа при температуре (170 ± 10) °С или поддерживать равноценный режим по параметрам время/температура.

После стерилизации, чтобы предотвратить растрескивание стеклянной посуды, перед ее изъятием из сушильного шкафа необходимо дать время для охлаждения, не вынимая из шкафа.

5.13.3 Проверка

Проверке подлежат стабильность и равномерность распределения температуры во всех зонах шкафа перед началом применения и после любого ремонта или модификации, которые могут повлиять на контроль температуры.

Стерилизационный сушильный шкаф должен быть оснащен калиброванным термометром, термопарой или устройством регистрации температуры, соответствующей точности, которые являются независимыми от автоматической системы регуляции температуры. Контролирующее устройство должно иметь разрешение 1 °С или менее при температуре, используемой в сушильном шкафу.

Температуру сушильного шкафа следует проверять и регистрировать в течение каждого цикла использования.

5.13.4 Обслуживание

По мере необходимости моют внутренние поверхности сушильного шкафа.

5.14 Микроволновая печь

5.14.1 Описание

Микроволновая печь — это устройство, в котором нагревание продукта осуществляется с помощью микроволнового излучения при атмосферном давлении.

5.14.2 Использование

Имеющиеся в настоящее время микроволновые печи рекомендуется использовать только для нагревания жидкостей или плавления агаровых питательных сред.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Не допускается нагревание сред, содержащих чувствительные к высокой температуре компоненты, если не проверено, что этот способ нагревания не оказывает влияния на свойства среды. До настоящего времени нет оценки эффективности микроволн для стерилизации питательных сред, и поэтому микроволновые печи не допускается использовать для этой цели.

Микроволновая печь должна обеспечивать нагревание жидкостей и питательных сред в контролируемых условиях с помощью цикла микроволнового излучения. Микроволновое поле должно быть гомогенным, чтобы избежать зон перегревания. Микроволновые печи, оснащенные поворотным столом или смесителем для микроволн, характеризуются лучшим распределением высокой температуры.

Не допускается использовать металлическое оборудование, включая металлические крышки. Крышки флаконов или пробки перед нагреванием в микроволновой печи необходимо приоткрыть.

Нагревание в течение более длинных периодов времени при меньшей номинальной мощности может обеспечить лучшее распределение высокой температуры.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Нагревание изделий следует проводить с осторожностью. Содержимое сосудов может перегреваться и выкипать, возможен взрыв флаконов.

Плавление агаровых питательных сред проводят при низкой мощности (например, режим раз-

мораживания) и нагревание воды (например, от 50 до 100 см³ воды в лабораторном стакане для микроволновой печи) рекомендуется для дополнительного контроля процесса нагревания.

После процесса нагревания следует подождать не менее 5 мин перед удалением содержимого из микроволновой печи.

5.14.3 Проверка

Необходимо определить подходящие время нагревания и мощность при первоначальном использовании микроволновой печи для различных объемов жидкостей и питательных сред, с которыми обычно работают в лаборатории. Таким образом обеспечивают оптимальный режим, при котором не происходит перегрев чувствительных продуктов.

5.14.4 Обслуживание

Печь немедленно очищают и моют при малейшем попадании брызг, а также через регулярные интервалы времени, в зависимости от интенсивности использования.

Регулярно осматривают целостность уплотнителя двери печи, а печь регулярно проверяют на потерю излучения через регулярные интервалы времени, используя датчик или аналогичное устройство, в соответствии с инструкцией изготовителя.

5.15 Машина для мытья стеклянной посуды

5.15.1 Описание

Лабораторные машины для мытья стеклянной посуды — это машины с электронным управлением, которые можно программировать на различные режимы мойки и полоскания (например, дистиллированной или деионизированной водой, или кислотой).

Лабораторные машины для мытья стеклянных пипеток могут иметь специальные устройства, разработанные специально для промывания узких отверстий пипеток.

5.15.2 Использование

Существует много типов машин для мытья стеклянной посуды, и обычно их устанавливают и эксплуатируют в соответствии с инструкцией изготовителя.

5.15.3 Проверка

Эффективность мытья оценивают посредством визуального осмотра, а в критических случаях проводят испытания, чтобы убедиться, что вымытая стеклянная посуда не содержит веществ, ингибирующих рост микроорганизмов.

Наличие щелочных и кислых остатков проверяют посредством использования универсального индикаторного раствора. Необходимо, чтобы pH оставался в пределах диапазона 6,5 — 7,3.

5.15.4 Обслуживание

Регулярное обслуживание осуществляют в соответствии с рекомендациями изготовителя и установленным графиком.

При интенсивном использовании машины для мытья стеклянной посуды или в регионах с повышенной жесткостью воды может потребоваться более частое обслуживание.

5.16 Оптический микроскоп

5.16.1 Описание

Существует несколько различных типов микроскопа: монокулярный, бинокулярный, с дисплеем, с камерой или оборудованием для флюоресценции и т. д., и с внутренним или наружным источником света. Для бактериологических экспертиз используют объективы с увеличением от 10× (сухая линза) до примерно 100× (объектив с масляной иммерсией и подпружинной турелью) для получения общего увеличения от 100× до 1000×. Фазово-контрастная и темнопольная микроскопия также является необходимым атрибутом исследований «мокрых препаратов».

5.16.2 Использование

Оптику микроскопа устанавливают в соответствии с инструкцией изготовителя. Оптическая ось света от лампы высокой интенсивности должна проходить через центр конденсора микроскопа, колено окуляра и линзу объектива в окуляр так, чтобы не возникали сферические и хроматические аберрации.

5.16.3 Обслуживание

Необходимо следовать инструкции изготовителя в отношении хранения, очистки и обслуживания. Необходимо предотвращать появление конденсата, возникающего при высокой влажности, так как это приводит к ухудшению качества линз.

Ежедневно или после каждого исследования удаляют иммерсионное масло с линз и прилегающих частей, используя ткань для протирки линзы. Можно использовать растворитель, рекомендованный изготовителем. Регулярно удаляют жир с поверхности окуляра, обусловленный прикосновением

ресниц.

Оптические системы могут легко повреждаться, и поэтому желательно, чтобы они обслуживались изготовителем.

5.17 Газовая горелка и прокаливатель проволоки

5.17.1 Описание

Газовые горелки (Бунзена) производят узкое открытое пламя и работают или от магистрального газа, или газа из баллона. Степень нагревания горелки регулируют с помощью изменения количества воздуха, смешиваемого с газом.

Газовые или электрические горелки используют в основном для стерилизации бактериологических петель и непосредственно проволоки путем нагрева их до температуры красного каления, а также стерилизации пламенем других мелких прочных элементов оборудования.

5.17.2 Использование

Прокаливатели используют для стерилизации металлических петель и прямой проволоки и являются предпочтительными при работе с патогенными бактериями, поскольку данные условия предотвращают разбрызгивание и риск перекрестного заражения сведен к минимуму.

Газовые горелки могут производить много тепла и создавать турбулентность воздуха в лаборатории.

Работу в стерильных условиях можно осуществлять без газовой горелки при использовании одноразовых материалов.

В боксах биологической безопасности следует отказаться от использования газовых горелок, поскольку пламя газовых горелок будет смешиваться с ламинарным потоком воздуха и нарушать его течение. В этом случае рекомендуется использование стерильного одноразового инструментария.

5.17.3 Обслуживание

Регулярно чистят и обеззараживают горелки и крышки прокаливателей, особенно в случае пролива или попадания брызг какой-либо микробной культуры на приборы.

5.18 Дозатор (устройство для разливки) питательных сред и реактивов

5.18.1 Описание

Дозатор – это инструмент или устройство, используемое для дозированной разливки питательных сред и реактивов в пробирки, флаконы или чашки Петри. Такие приборы включают средства от простых мерных цилиндров, пипеток, ручных шприцев, автоматических шприцев и перистальтических насосов до приборов, программируемых электронными устройствами с различными автоматическими настройками дозирования.

5.18.2 Использование

Чистое оборудование, используемое для дозированной разливки питательных сред и реактивов, должно быть свободно от ингибирующих веществ, подавляющих рост микроорганизмов. Необходимо использовать отдельные пробирки для селективных сред, чтобы минимизировать выщелачивание/перенос таких веществ.

Если требуется разливка стерильных питательных сред в условиях стерильности, все части дозатора, контактирующие со средами, должны быть стерильными.

5.18.3 Проверка

Максимально допустимая погрешность измерения дозатора при дозировании объема питательной среды, который необходимо разлить, не должна превышать ± 5 %.

Максимальная допустимая погрешность измерения объема разлитой жидкости, используемой для приготовления десятичных разведений, ± 2 %.

Дозированные объемы жидкостей проверяют до первого применения, а затем регулярно в соответствии с зарегистрированным графиком и всегда после любых наладочных операций, которые могут влиять на дозирование объема.

5.18.4 Очистка и обслуживание

Наружную поверхность дозатора очищают после каждого использования. Тщательно моют и ополаскивают все части дозатора, которые входят в контакт с продуктом, и, если требуется для разливки стерильной жидкости, стерилизуют их. Не допускается использовать дезинфицирующие средства, входящие в контакт с продуктом, который будет разливаться, так как они могут обладать ингибирующими свойствами.

Все автоматические дозаторы должны содержаться в хорошем состоянии посредством постоянного обслуживания в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.19 Вихревой механический смеситель (Вортекс)

5.19.1 Описание

Этот прибор облегчает гомогенизирующее смешивание жидких сред (например, десятикратных разведений и проб жидкости для исследований) или суспензий бактериальных клеток в жидкости.

Перемешивание достигается с помощью эксцентричного вращательного движения содержимого пробирки или контейнера (создаваемого водоворотом).

5.19.2 Использование

Прижимают основание пробирки или контейнера, содержащих жидкость, которую надо перемешать, к дну смесителя. Скорость перемешивания регулируется с помощью изменения оборотов двигателя или угла контакта с дном смесителя.

Оператор должен следить за тем, чтобы в течение перемешивания не произошло разбрызгивания. Это осуществляется посредством регулирования скорости и удерживания пробирки приблизительно на одной трети ее длины от верхнего края, чтобы лучше контролировать положение пробирки и, следовательно, избежать слишком высокого подъема жидкости в пробирке.

Необходимо предпринять соответствующие меры предосторожности, чтобы свести к минимуму выброс аэрозолей при открывании контейнеров после перемешивания.

5.19.3 Проверка

Об адекватном перемешивании свидетельствует появление воронки по всей глубине жидкости в процессе перемешивания.

5.19.4 Обслуживание

Смеситель содержат в чистоте. Если происходит разбрызгивание, прибор обеззараживают, используя применяемое в лаборатории дезинфицирующее средство.

5.20 Устройство для подсчета колоний

5.20.1 Описание

Ручные устройства подсчета колоний используют счетное устройство, приводимое в действие под давлением, и обычно выдающее звуковой сигнал каждой единицы счета и цифровую индикацию общего количества колоний. Они могут быть простыми устройствами, похожими на авторучку или могут состоять из освещенного столика с калиброванной сеткой для помещения чашки и увеличительного экрана для облегчения подсчета колоний. Автоматические электронные счетчики колоний, включающие анализаторы изображения, работают в комбинации с аппаратными средствами ЭВМ и системами программного обеспечения; используют также видеокамеры и монитор.

5.20.2 Использование

Необходимо выполнять инструкции изготовителя. Регулируют чувствительность автоматического счетчика, чтобы обеспечить подсчет всех подлежащих подсчету колоний. Автоматические электронные счетчики колоний также требуют отдельного программирования, если их применяют с различными типами питательных сред и матриц и обеспечивают надлежащий подсчет целевых колоний на поверхности агара или внутри питательной среды.

5.20.3 Проверка

Необходимо регулярно осуществлять проверку подсчета вручную, чтобы гарантировать точность подсчета, выполненного счетчиком колоний.

Кроме того, автоматические счетчики колоний следует проверять каждый день с калибровочной чашкой, содержащей известное число подсчитываемых частиц или колоний для подсчета.

5.20.4 Обслуживание

Оборудование необходимо содержать в чистоте, свободным от пыли; следует избегать повреждения поверхностей, которые являются существенным элементом процесса подсчета. Осуществляют плановое регулярное обслуживание электронных счетчиков, включающих анализаторы изображения, в соответствии с инструкциями изготовителя, с подходящей частотой.

5.21 Оборудование для культивирования в измененной атмосфере

5.21.1 Описание

Может применяться сосуд, герметично запечатанный, или любое другое подходящее оборудование, которое способно поддерживать условия измененной атмосферы (например, необходимые для анаэробиоза) в течение всего периода инкубации питательной среды. Допускается использовать другие системы с равноценными характеристиками типа анаэробных камер.

При установке и обслуживании следуют инструкциям изготовителя оборудования.

5.21.2 Использование

Состав требуемой атмосферы может быть достигнут посредством заполнения газовой смесью (например, из газового баллона) после вытеснения воздуха из сосуда, изменением атмосферы в шкафу или любыми другими подходящими средствами (например, газовые пакеты, имеющиеся в продаже).

Инкубация в анаэробных условиях требует атмосферы, содержащей менее чем 1 % кислорода, от 9 % до 13 % двуокиси углерода; микроаэробное инкубирование требует атмосферы, содержащей 5 % — 7 % кислорода и приблизительно 10 % двуокиси углерода.

Условия могут требовать модификации в зависимости от потребностей конкретного микроорганизма.

5.21.3 Проверка

В каждую камеру при использовании помещают биологический или химический индикатор для контроля за качеством атмосферы. Рост контрольного штамма или изменение цвета химического индикатора свидетельствует, что соответствующие условия инкубации достигнуты.

5.21.4 Обслуживание

Если катализатор соответствует условиям исследования, его необходимо установить в соответствии с инструкциями изготовителя. Если имеется клапан, его необходимо чистить и смазывать, чтобы гарантировать надлежащее функционирование. Заменять его следует по мере необходимости.

Оборудование необходимо регулярно очищать и проводить санитарную обработку.

5.22 Центрифуга

5.22.1 Описание

Центрифуги — это механические устройства, в том числе управляемые с помощью электроники, которые используют центробежную силу для отделения взвешенных частиц, включая микроорганизмы, от жидкостей.

5.22.2 Использование

В некоторых случаях концентрация определяемых микроорганизмов достигается путем центрифугирования жидких проб, чтобы получить осадок, который можно снова суспендировать в жидкости и подвергнуть дальнейшему исследованию.

Необходимо принять все меры предосторожности, чтобы предотвратить возникновение аэрозоля и перекрестное заражение. С этой целью необходимо надлежащим образом обращаться с оборудованием и использовать закрытые и стерильные центрифужные пробирки или другие специальные сосуды.

5.22.3 Проверка

Когда скорость центрифугирования максимальная, как указано в инструкции по применению, индикатор скорости или установочные параметры следует регулярно проверять по калиброванному независимому тахометру, а также после существенного ремонта или модификаций.

5.22.4 Обслуживание

Центрифуги регулярно очищают и обеззараживают. В случае пролива материала с микроорганизмами или потенциально зараженных проб центрифуги дополнительно очищают и обеззараживают.

Необходимо постоянное обслуживание центрифуг.

5.23 Нагревательная плитка и кожух с нагревом

5.23.1 Описание

Нагревательные плитки и кожухи представляют собой нагревательные устройства с термостатическим контролем. Некоторые нагревательные плитки и кожухи имеют системы магнитных мешалок.

5.23.2 Использование

Нагревательные плитки и кожухи с нагревом, оборудованные системами магнитных мешалок, используют для нагревания относительно больших объемов жидкостей, таких как питательные среды.

Нельзя использовать нагревательные плитки и кожухи без систем перемешивания при приготовлении питательных сред.

5.23.3 Обслуживание

Все брызги и пролитый материал удаляют сразу после остывания нагревательного прибора.

5.24 Дозатор для нанесения посевного материала на поверхность сред по спирали (спиральный дозатор)

5.24.1 Описание

Спиральный дозатор — это аппарат, который распределяет предварительно установленный объем жидкости по поверхности вращающихся чашек с агаром. Дозирующая игла движется от центра чашки к наружному ее краю по траектории, называемой спиралью Архимеда. Распределяемый объем уменьшается по мере движения иглы от центра к краю чашки таким образом, чтобы существовала обратно пропорциональная зависимость между выливаемым объемом и радиусом спирали. Объем пробы, распределенной на любой конкретный сегмент, известен и постоянен. Для загрузки и разливки жидкостей требуется источник вакуума, плунжер с электроприводом, если в приборе используется одноразовый микрошприц, либо аналогичная система.

5.24.2 Использование

Прибор применяют для разливки жидкой пробы, гомогенной пробы или разведения на соответствующей агаровой чашке для подсчета колоний. После инкубации колонии распределяются по линиям, по которым была распределена жидкость. Подсчитывают количество колоний на определенной площади, используя сетку для подсчета, поставляемую с оборудованием, и определяют количество колоний.

Дозирующая система должна проходить санитарную обработку и ополаскиваться дистиллированной или деионизированной водой перед и после разливки каждой пробы. Дезинфекцию можно проводить, например, путем промывки раствором, содержащим 0,5 % — 1,0 % свободного хлора (по массе).

Оборудование, которое функционирует по другому принципу (например, когда используют одноразовые микрошприцы с плунжером), следует использовать в соответствии с инструкцией изготовителя.

Поверхность чашек с агаром, которые используют со спиральным дозатором, должна быть ровной и без воздушных пузырей.

Чашки не должны содержать избыточную поверхностную влагу, что позволит гарантировать образование отдельных колоний.

Во избежание закупорки перед загрузкой суспензии пробы и использованием порции надосадочной жидкости следует добиться осаждения частиц. Допускается также использование мешков для смесителей с встроенными фильтрами.

5.24.3 Проверка

Необходимо обеспечить центровку чашек Петри на поворотном столе.

Рисунок распределения пробы следует проверять ежедневно с помощью смываемых чернил. Рисунок распределения пробы должен быть наиболее плотным около центра пластины, где начинается разливка пробы, и становиться менее плотным в точке подъема кончика иглы дозатора.

Спираль должна быть полной и не иметь разрывов. Чистая часть чашки должна быть в центре и иметь диаметр приблизительно 2,0 см. Положение иглы в моменты начала и завершения инокуляции должно быть проверено в то же самое время при помощи отметок на поворотном столе.

Если рисунок является неправильным, иглу следует обрезать в соответствии с инструкцией изготовителя. Следует выполнять проверку, чтобы обеспечить расположение наконечника дозирующей иглы под правильным углом к поверхности агара, используя вакуум для удерживания покровного стекла относительно передней части иглы. Покровное стекло должно быть параллельно поверхности агара.

Стерильность спирального дозатора следует проверять с помощью стерильной воды для каждой партии исследуемых проб.

Гравиметрическую проверку распределяемого объема необходимо выполнять регулярно с помощью дистиллированной воды. Полученная масса должна быть в пределах максимально допустимой ошибки ± 5 % от ожидаемой массы для распределенного объема.

5.24.4 Обслуживание

Пролитый материал необходимо немедленно удалить, а дозатор регулярно очищать.

Дозатор необходимо обслуживать и проверять в зависимости от интенсивности использования.

5.25 Дистилляторы, деионизаторы и установки обратного осмоса

5.25.1 Описание

Данные устройства применяют для получения дистиллированной или деионизированной (деминерализованной) воды требуемого качества (см. ISO 11133) для получения микробиологических питательных сред или реактивов и для других работ в лаборатории.

5.25.2 Использование

Устанавливают, проверяют и используют оборудование в соответствии с инструкцией изготовителя, принимая во внимание местоположение подачи воды в лаборатории, электрического питания и стоков для отходов.

5.25.3 Проверка

Качество воды следует проверять регулярно, и когда ее используют после хранения, на электропроводность, которая должна быть не более 50 мкСм/см (что эквивалентно удельному сопротивлению ≥ 40000 Ом·см) для приготовления реактивов и питательных сред.

После хранения воды или пропускания ее через ионообменник, перед использованием воду проверяют на микробное загрязнение в соответствии с ISO 11133.

5.25.4 Обслуживание

Дистилляторы необходимо промывать и освобождать от накипи при помощи кислоты, например, лимонной кислоты с массовой долей 5 % — 10 % с частотой, которая зависит от жесткости пропускаемой через них воды. Затем их следует тщательно промывать свежей водой с целью удаления остатков кислоты. Деионизаторы и установки обратного осмоса обслуживают в соответствии с инструкцией изготовителя.

5.26 Таймеры и счетчики времени

5.26.1 Описание

Таймеры и интегральные счетчики времени — это приборы, которые используют в лаборатории во многих испытаниях для определения временных периодов, когда их продолжительность точно установлена и является определяющим параметром.

5.26.2 Использование

Аналоговый и цифровой карманный компьютеры или настольные таймеры, используемые для контроля продолжительности лабораторных операций (например, окрашивания микробных мазков, гомогенизации проб), должны содержаться в хорошем рабочем состоянии и обеспечивать необходимую точность.

С встроенными интегральными таймерами на лабораторном оборудовании (например, на автоклавах, центрифугах, гомогенизаторах) необходимо обращаться в соответствии с инструкцией изготовителя. Эти таймеры должны обеспечивать требуемую точность в зависимости от степени важности данного испытания.

5.26.3 Проверка

Регулярно и после значительного ремонта осуществляют проверку таймеров, используемых в лабораторных операциях, продолжительность которых является решающим параметром для получения результата. Проверку осуществляют по сигналам службы точного времени.

5.26.4 Обслуживание

Регулярно чистят и проверяют таймеры на надлежащее функционирование.

Интегральные счетчики времени следует проверять в рамках технического обслуживания прибора.

5.27 Пипетки и пипеточные дозаторы

5.27.1 Описание

Пипетки стеклянные или одноразовые пластмассовые представляют собой устройства, используемые для переноса объемов жидких или вязких материалов. С помощью градуированных пипеток измеряют и переносят измеренные объемы с точностью, зависящей от требований.

Автоматические (механические) пипеточные дозаторы, которые оснащаются пластмассовыми наконечниками, — устройства, которые отбирают и выдают установленные или регулируемые объемы жидкостей под действием поршня с ручным или электрическим приводом.

5.27.2 Использование

Не допускается использование поврежденных или разбитых (бракованных) пипеток.

Стерильные пастеровские или мерные пипетки и наконечники пипеточного дозатора следует затыкать неабсорбирующим ватным тампоном, чтобы предотвратить заражение, когда проводится работа с микробными культурами.

Резиновые груши, используемые на пастеровских или градуированных пипетках, и наконечники для пипеточных дозаторов должны иметь правильный размер, чтобы предотвратить протекание и обеспечить эффективную работу.

Более подробная информация приводится в [51].

5.27.3 Проверка

Мерные пипетки проверяют, чтобы подтвердить перенос требуемого объема, если изготовитель не сертифицирует их точность (правильность и прецизионность).

Калибровка пипеток/дозаторов описана в ISO 835 и ISO 8655 (все части), главным образом, в ISO 8655-2.

Перед использованием новые пипеточные дозаторы проверяют. Проверку проводят через регулярные интервалы времени в зависимости от частоты и характера использования. Проверкой подтверждают, что приборы соответствуют максимально допустимой погрешности, которая должна составлять 2 % в случае разливаемых объемов десятичного разведения или инокулята (в целях повышения точности и снижения неопределенности конечных результатов испытаний предпочтительно, чтобы максимальная допустимая погрешность была ± 2 %) или 5 % в других случаях. Выполняют промежуточные гравиметрические проверки, используя дистиллированную или деионизированную воду для того, чтобы переносимые объемы оставались в рамках максимально допустимых ошибок.

5.27.4 Обслуживание

Дезактивируют, моют и стерилизуют все пипетки многоразового пользования и автоматические пипеточные дозаторы после каждого использования.

Если цилиндры или поршни автоматических пипеточных дозаторов стали загрязненными при использовании, их вынимают для деконтаминации и очистки. После повторной сборки их повторно калибруют. Если это невозможно сделать в лаборатории, пипеточные дозаторы возвращают изготовителю для повторной сборки и повторной калибровки.

5.28 Термометры и температурно-контролирующие устройства, включая автоматические записывающие устройства

5.28.1 Описание

Термометры бывают стеклянными ртутными или стеклянными спиртовыми и используются для измерения температуры в диапазоне лабораторной деятельности.

Другие устройства контроля температуры включают платиновые термометры сопротивления и инструменты, которые имеют термоэлектроды для измерения температуры и обеспечивают визуальный контроль и запись на бумажном или электронном носителе изменения температуры во времени.

Контрольные термометры и другие устройства контроля температуры должны быть калиброваны в соответствии с национальными или международными стандартами. Они должны использоваться только для контроля, а не для повседневной работы.

Рабочие термометры и другие устройства регистрации температуры должны быть калиброваны таким образом, чтобы позволять отслеживать колебания температуры в соответствии с национальными и международными стандартами.

Примечание — В качестве рабочих термометров могут быть также использованы устройства надлежащей точности, которые соответствуют международным или национальным требованиям, после проверки их работы.

5.28.2 Использование

Термометры и другие устройства контроля температуры должны обеспечивать измерение температуры с установленной максимально допустимой погрешностью, зависящей от степени значимости данного испытания.

Неопределенность измерения для мониторинга температуры должна быть по меньшей мере в четыре раза меньше, чем диапазон требуемой максимально допустимой погрешности. Например, для заданной максимально допустимой погрешности ± 1 °С погрешность измерения должна быть не более 0,2 °С; для заданной максимально допустимой погрешности ± 0,5 °С погрешность измерения должна быть не более 0,1 °С.

Неопределенность измерения калибровки контрольного термометра необходимо также принимать в расчет при определении рабочей температуры.

В целях обеспечения достоверных показаний термометры или термоэлементы, помещенные в воздушные термостаты, должны быть в надлежащих контейнерах, заполненных глицерином, жидким парафином или полипропиленгликолем, являющимися буфером, предохраняющим от потерь тепла, которые происходят при открывании дверцы. При использовании термометров частичного погружения полностью погружают только шарик термометра, или используют аналогичное средство обеспечения стабильности.

Термометры, помещенные в водяные бани, должны быть погружены в воду в соответствии с индивидуальными техническими требованиями, например, термометры частичного погружения необ-

ходимо погрузить на глубину, указанную для данного термометра (как правило, 76 или 100 мм).

Недопустимо использование термометров в случае, если столбик ртути или спирта поврежден.

Термометры, имеющие ртуть в стеклянной оболочке, хрупкие, и если возникает опасность их повреждения, они должны быть помещены внутри защитных приспособлений, которые не создают препятствий измерению температуры.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Ртуть опасна для здоровья. Разбитые термометры и разлившуюся ртуть удаляют в соответствии с инструкциями.

5.28.3 Проверка

Контрольные термометры должны быть калиброваны по всему диапазону отслеживаемых национальных или международных стандартов перед начальным использованием и затем не реже одного раза каждые пять лет. Промежуточную калибровку по одной точке (например, температуру таяния льда) следует выполнять для проверки точности работы термометра.

Контрольные термопары должны быть полностью калиброваны по прослеживаемым национальным или международным стандартам перед начальным использованием, регулярно проверяться с частотой, установленной в лаборатории, в соответствии с инструкцией изготовителя. Промежуточные проверки следует проводить по показаниям контрольного термометра для проверки точности работы прибора.

Другие устройства контроля температуры (такие как приемники радиоволн) должны быть калиброваны по прослеживаемым национальным или международным стандартам в соответствии с инструкцией изготовителя.

Рабочие термометры и термоэлементы должны быть проверены при температуре таяния льда и/или по контрольному термометру в диапазоне рабочих температур.

5.28.4 Обслуживание

Термометры и термоэлементы необходимо содержать в чистоте и рабочем состоянии.

Другие средства контроля температуры необходимо поддерживать в соответствии с инструкцией изготовителя.

5.29 Иммуномагнитный сепаратор

5.29.1 Описание

Это оборудование применяют, чтобы отделить и сконцентрировать исследуемые микроорганизмы в жидких культурах посредством парамагнитных бусинок, покрытых соответствующими антителами.

Ручные сепараторы состоят из ротационного миксера, способного создавать скорость от 12 до 20 об/мин, и концентратора частиц со сменным полосовым магнитом.

Автоматические сепараторы используют устройства, подобные гребенке с множеством магнитных стержней в виде гребней и штативов с пробирками. Магнитные частицы перемещаются от пробирки к пробирке и осуществляют полную процедуру разделения, включая стадии отмывок, выполняемых автоматически в условиях закрытого пространства.

5.29.2 Использование и проверка

При использовании руководствуются инструкцией изготовителя и теми инструкциями, которые приведены в конкретных стандартах (например, для *E. coli* O157).

В ручных системах проверяют скорость вращения миксера.

В ручных и автоматизированных системах перед использованием проверяют, чтобы система обладала способностью изолировать малые количества интересующего микроорганизма.

Во время процедуры ручного разделения не допускается перекрестное заражение, возможность которого важно оценить.

5.29.3 Обслуживание

Оборудование осматривают и поддерживают в соответствии с инструкцией изготовителя.

5.30 Система фильтрации

Используемая система фильтрации должна соответствовать описанной в ISO 8199.

5.31 Прочее оборудование и программное обеспечение

Прочее оборудование и связанное с ним программное обеспечение должно обеспечивать требуемую точность и выполнение спецификаций, необходимых для проводимых исследований. Программы калибровки и проверки по возможности следует разрабатывать для ключевых количеств и значений там, где эти свойства оказывают существенное влияние на результат. Перед повседневной работой по воз-

можности калибруют или проверяют оборудование, чтобы подтвердить его соответствие требованиям лаборатории и техническим условиям для выполнения необходимых стандартных операций. Любые изменения конфигурации или модификации программ, проведенные в лаборатории, должны быть проверены, чтобы гарантировать, что измененное программное обеспечение дает правильный результат.

6 Подготовка стеклянной посуды и других лабораторных материалов

6.1 Подготовка

Стеклянная посуда и другие лабораторные материалы, используемые в микробиологии, должны иметь удобную конструкцию, использоваться должным образом и проходить соответствующую подготовку, чтобы гарантировать их чистоту и/или стерильность вплоть до момента использования. Для ополаскивания многократно используемой стеклянной посуды после промывания необходимо использовать воду лабораторной степени чистоты в соответствии с [50]. Проверку посуды на наличие остатков щелочи или кислоты можно проводить с использованием универсального индикаторного раствора. Значение pH должно быть в диапазоне 6,5 — 7,3.

Стеклянная посуда должна быть такой, чтобы предотвратить или ограничить контакт между оператором и инфекционным материалом.

Пробирки и флаконы должны быть закрыты соответствующими пробками. Если необходимо, стеклянная посуда, которая будет стерилизоваться (например, пипетки), должна быть помещена в специальные контейнеры или обернута в соответствующий материал (специальная бумага, алюминиевая фольга и т.д.). Для стеклянной посуды, которая стерилизуется в автоклаве пустой, следует обеспечить свободный доступ пара, иначе стерилизация не будет достигнута.

6.2 Стерилизация/деконтаминация

6.2.1 Общие положения

Необходимо регистрировать температуру и продолжительность стерилизации/деконтаминации. Могут быть использованы индикаторы стерилизации, которые способны различать стерильный и нестерильный материалы.

6.2.2 Стерилизация сухим теплом

Стеклянную посуду и т. п. стерилизуют в стерилизационном сушильном шкафу при температуре (170 ± 10) °С в течение не менее 1 ч или при аналогичном режиме.

6.2.3 Стерилизация влажным теплом (паром)

Стерилизация влажным паром под давлением является наиболее эффективным методом стерилизации лабораторной стеклянной посуды и других материалов. Температура в камере автоклава должна составлять (121 ± 3) °С в течение не менее 15 мин (см. 5.6).

6.2.4 Деконтаминация с помощью химических реагентов

Используют химические реагенты (например, вещества на основе хлора, спирты, четвертичные соединения аммония) в необходимых концентрациях и в течение необходимого времени воздействия.

Следует гарантировать, чтобы остатки химических веществ не влияли на жизнедеятельность микроорганизмов.

6.3 Одноразовое оборудование и материалы

Одноразовое оборудование и материалы могут использоваться вместо оборудования и материалов многократного использования (стеклянной посуды, чашек Петри, пипеток, бутылок, пробирок, петель, шпателей и т.д.), если они аналогичны по техническим условиям.

Необходимо проверить, чтобы такое оборудование подходило для использования в микробиологии (в особенности, это касается его стерильности), и чтобы материал не содержал веществ, подавляющих рост микроорганизмов (см. [39]).

6.4 Хранение чистой стеклянной посуды и других материалов

Во время хранения необходимо защищать чистую стеклянную посуду и материалы от попадания пыли и хранить ее в условиях, сохраняющих их чистоту.

6.5 Обращение со стерильной стеклянной посудой и другими материалами

Стеклянная посуда и материалы должны содержаться в условиях, которые гарантируют их сте-

рильность. Одноразовое оборудование хранят в соответствии с инструкцией изготовителя, следя за тем, чтобы не было загрязнения упаковки. Оборудование, подготовленное в лаборатории, хранят в чистоте.

Если стерильное оборудование предназначено для микробиологических исследований, на упаковках отмечают срок годности (или дату изготовления).

6.6 Применение деконтаминации и дезинфекции

6.6.1 Деконтаминация одноразового оборудования

До удаления одноразового оборудования его обеззараживают в лаборатории или его забирает специализированная фирма.

Помимо методов, описанных в этом разделе, дополнительно применяют сжигание. Если в помещении есть установка для сжигания отходов, деконтаминацию и удаление допускается выполнять в одну стадию.

6.6.2 Деконтаминация стеклянной посуды и материалов перед использованием

Обычно деконтаминацию путем стерилизации оборудования следует осуществлять влажным паром (см. 6.2.3) или сухим горячим воздухом (см. 6.2.2).

В некоторых случаях (например, при отборе образцов в полевых условиях) может использоваться химическая деконтаминация. После такой обработки необходимо убедиться, чтобы остатки химических веществ не влияли на жизнедеятельность микроорганизмов.

6.6.3 Деконтаминация стеклянной посуды и материалов после использования

Материалы для деконтаминации и обезвреживания необходимо помещать в контейнеры, например, в полиэтиленовые пакеты для автоклавирования. Автоклавирование — предпочтительный метод для всех процессов деконтаминации [не менее 30 мин при температуре (121 ± 3) °С]. Автоклав должен быть загружен таким образом, чтобы обеспечивать проникновение высокой температуры в контейнеры (например, без излишней упаковки), следя за тем, чтобы крышки/пробки были приоткрыты, а пакеты — открыты.

Могут использоваться альтернативные методы, отличные от автоклавирования, если это допускается инструкциями.

Перед промыванием автоклавируют все оборудование, которое было в контакте с микробиологическими культурами (плотными или жидкими питательными средами), включая контейнеры многократного использования.

Во время исследования допускается использовать деконтаминацию методом погружения в свежеприготовленный раствор дезинфицирующего средства для стойких к коррозии небольших элементов (например, пипеток).

Пастеровские пипетки используют однократно. Дополнительная информация приведена в [51].

Большинство дезинфицирующих средств (см. приложение А) обладают некоторым токсическим действием. Поэтому при работе с концентрированным дезинфицирующим средством необходимо надевать перчатки и защитные очки.

Материалы, загрязненные микроорганизмами группы опасности 3, а также их контейнеры перед сжиганием необходимо подвергать автоклавированию.

6.7 Обработка отходов

Надлежащая методика удаления загрязненных материалов не влияет напрямую на качество исследования проб, кроме тех случаев, когда это приводит к риску перекрестного загрязнения. Данная процедура — это аспект надлежащей лабораторной практики.

Обработка отходов должна проводиться в соответствии с национальными регламентами, касающимися аспектов окружающей среды, охраны здоровья и безопасности.

Система идентификации и разделения загрязненных материалов и контейнеров должна быть установлена:

- для незагрязненных отходов (например, проб пищевых продуктов, не содержащих культуры микроорганизмов), которые можно выбрасывать вместе с общими отходами;
- игл, скальпелей, ножей, разбитого стекла;
- загрязненного материала для автоклавирования и рекуперации; и
- загрязненного материала для автоклавирования и утилизации, либо только для утилизации, если материал подлежит прокаливанию (вместе с тем, см. специальные требования к микроорганизмам группы опасности 3, они приведены ниже).

6.8 Мойка

Оборудование многократного использования моют только после его обеззараживания. После мойки все оборудование ополаскивают деионизированной водой.

Чтобы облегчить операции по очистке, можно использовать специализированное оборудование (например, моющую машину для пипеток, посудомоечную машину, ультразвуковую ванну).

Необходимо устранить влияние остатков на последующий рост микроорганизмов. Может потребоваться дополнительное ополаскивание или проверки, чтобы убедиться, что оборудование не содержит остатков моющих средств.

7 Приготовление и стерилизация питательных сред

Питательные среды приготавливают и стерилизуют в соответствии с ISO 11133.

8 Лабораторные пробы

8.1 Отбор проб

8.1.1 Общие положения

Отбор проб и план выборочного контроля не входят в область компетенции настоящего стандарта. Следует обеспечить условия, чтобы лаборатория получала пробу, которая была бы репрезентативной для данной партии продукции и не была повреждена или изменена при транспортировании и хранении.

Необходимо предотвратить загрязнение пробы атмосферным воздухом, контейнером для отбора проб, используемыми устройствами для отбора проб и ненадлежащим обращением с пробой. Контейнер для проб не следует заполнять более чем на три четверти, чтобы избежать разлива пробы и обеспечить надежное перемешивание пробы в лаборатории.

Четко и полностью необходимо идентифицировать пробы и регистрировать всю информацию о пробе.

Для достоверности результатов в лаборатории необходимо иметь сведения о температуре во время отбора пробы, и поэтому температуру регистрируют в информационном листке.

Проба должна быть представлена в оригинальном закрытом контейнере.

Если проба большая или находится в очень большом контейнере, для доставки в лаборатории применяют стерильный типовой контейнер для проб, в котором переносят часть пробы, отобранной в стерильных условиях.

Стерильный типовой контейнер может быть открыт только на время, необходимое для внесения в него пробы, после чего его необходимо немедленно закрыть.

8.1.2 План осуществления выборки

Осуществление выборки не является предметом описания настоящего стандарта. См. соответствующий стандарт, в котором описаны данные положения.

8.2 Транспортирование

Способ транспортирования проб в лабораторию должен гарантировать их сохранность.

Пробы в лабораторию доставляют быстро, поддерживая исходные условия хранения.

Проба должна быть упакована таким способом, чтобы не было повреждений упаковки или потери пробы.

На этикетке продукта должны быть указания о необходимости хранения пробы в холодильнике (на холоде).

Пробы, не требующие охлаждения или замораживания, можно упаковывать в контейнер, используя соответствующий упаковочный материал, чтобы избегать повреждений.

Не следует использовать дробленый лед, поскольку при поломке или повреждении контейнера может произойти загрязнение пробы.

Если нет других указаний в конкретных стандартах (например, ISO 6887), во время транспортирования рекомендуют соблюдение следующих значений температуры:

- устойчивые продукты: температура окружающей среды (не более 40 °С);
- замороженные или свежезамороженные изделия: не более минус 15 °С, предпочтительно не более минус 18 °С;
- другие изделия, не устойчивые при окружающей температуре: 1 °С — 8 °С;

- пробы на тампонах: см. [46] и [47].

Когда параметры условий транспортирования не определены, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны согласовывали продолжительность и температуру транспортирования.

8.3 Получение проб

При получении проб необходимо проверить их состояние.

Если их состояние неудовлетворительное или если проб недостаточно, лаборатория может отказаться от проб.

В определенных случаях после обсуждения и соглашения с клиентом они могут быть исследованы.

Однако отчет об испытаниях должен включать пункт о достоверности результатов.

Пробы, поступившие в лабораторию, регистрируют таким образом, чтобы можно было фиксировать их продвижение до момента составления протокола испытаний. Идентичность и кодирование проб и отчетов должны обеспечивать прослеживаемость на всех стадиях исследования в лаборатории.

Если необходимо, наружные поверхности контейнеров должны быть дезинфицированы при использовании соответствующих дезинфицирующих средств.

Контейнеры для проб проверяют на наличие очевидных физических дефектов.

Необходимо обратить внимание на следующее:

- дату (и время, если необходимо) получения пробы;
- сведения об отборе проб (дата и время отбора пробы, если это важно и известно, условия отбора пробы);
- ФИО клиента и адрес.

При получении скоропортящихся проб отмечают температуру транспортирования или температуру условной пробы, транспортируемой вместе с настоящей именно для регистрации температуры.

Пробы необходимо исследовать как можно в более короткие сроки после их получения, предпочтительно в течение 24 ч, или по согласованию с заинтересованной стороной.

Для быстропортящихся продуктов исследование необходимо начать в течение 24 ч с момента отбора пробы. Для скоропортящихся изделий (таких как рыба и сырое молоко) исследование необходимо начать в течение 36 ч.

Если крайние сроки исследования, упомянутые выше, не могут быть выполнены, образцы можно заморозить при температуре не более минус 15 °С, предпочтительно минус 18 °С, при условии, что на восстановление искомых микроорганизмов это не влияет, и их количество изменится незначительно по сравнению с исходным продуктом.

8.4 Хранение

Пробы, подлежащие экспертизе, хранят в условиях, которые сводят к минимуму изменение количества присутствующих микроорганизмов.

Рекомендуются следующие температуры хранения проб:

- устойчивые продукты: температура окружающей среды (18 °С — 27 °С);
- замороженные или свежезамороженные изделия: не более минус 15 °С, предпочтительно не более минус 18 °С;
- другие продукты, не устойчивые при температуре окружающей среды, включая испорченные пищевые продукты (3 ± 1) °С (см. ISO 6887-2, ISO 6887-3, ISO 6887-4);
- пробы на тампонах: см. [46] и [47].

8.5 Проба (навеска) для исследования

8.5.1 Специальные правила для отбора проб (навесок) для исследований

См. соответствующую часть ISO 6887, где описаны специальные правила для получения образцов для исследований и приготовления гомогенатов и исходной суспензии.

8.5.2 Сохранение и уничтожение лабораторных проб

Кроме особых случаев, лабораторные пробы хранят до получения всех необходимых результатов исследования и более длительное время, если это необходимо. В этом случае пробы упаковывают в стерильный контейнер (например, в пластиковый пакет) и хранят при исходной температуре хранения.

Скоропортящиеся изделия необходимо заморозить.

Примечание — Обычной практикой является повторное исследование проб из-за возможных изменений микробного статуса.

9 Экспертиза (исследование)

9.1 Гигиенические меры предосторожности при проведении исследований

Чтобы избежать загрязнения окружающей среды и анализируемых проб микробиологические исследования проводят в отдельной комнате или зоне, или в боксе биологической безопасности.

До открывания обычных проб участок вокруг предполагаемого места открывания обрабатывают 70 %-ным (по объему) спиртом (или другим аналогичным продуктом) и дают ему испариться. Перед вскрытием стерильной упаковки погружают область предполагаемого места открывания в раствор, содержащий свободный хлор концентрацией 100 — 200 млн$^{-1}$ (или в другой подходящий стерилизующий раствор) в течение не менее 10 мин, чтобы уничтожить микроорганизмы, которые могли бы заразить пробу.

Любой инструмент, который используют для открывания упаковки и извлечения пробы целиком или части пробы (консервный нож, ножницы, ложку, щипцы, пипетку и т. д.), необходимо стерилизовать.

Область, прилегающая к рабочему месту, должна быть вымыта соответствующим дезинфицирующим средством до начала исследования.

Непосредственно перед началом исследования необходимо вымыть руки, и если руки загрязнились во время исследования, то их необходимо вымыть во время исследования.

Все используемые инструменты должны быть стерильными и защищены от заражения до и в течение исследования.

Все приборы и используемые инструменты необходимо поместить в подходящий контейнер для последующей утилизации или стерилизации.

Необходимо соблюдать меры предосторожности и проводить работу, насколько это возможно, в стерильных условиях. Например:

a) требуется удостовериться, что рабочая зона находится в чистом состоянии, а все возможные источники загрязнения удалены или сведены к минимуму, и отсутствуют сквозняки (то есть двери и окна закрыты). Следует избегать ненужных перемещений персонала во время исследования;

b) перед началом и после работы необходимо провести обеззараживание рабочих поверхностей соответствующим дезинфицирующим средством;

c) до начала работы следует убедиться, что все необходимые материалы и оборудование для выполнения работы являются доступными;

d) работу необходимо выполнять без задержек;

e) следует разделить «чистую» и «грязную» работу во времени и по месту выполнения (это особенно важно при работе с пробами высокого риска, такими как сырое мясо и сырые яйца);

f) для работы обычно используют одноразовое оборудование;

g) если содержимое упаковки с одноразовыми пипетками, чашками Петри и другими необходимыми инструментами не используют полностью в процессе анализа, необходимо проследить, чтобы упаковка была надлежащим способом закрыта после изъятия необходимого количества инструментов;

h) любой зараженный материал, попавший на поверхность рабочего места, немедленно обрабатывают с помощью ватных хлопковых тампонов или любого другого подходящего средства, пропитанного 70 %-ным (по объему) спиртом или любым другим подходящим дезинфицирующим средством. Затем рабочее место моют и дезинфицируют, после чего продолжают исследование;

i) для продуктов, которые могут содержать патогенные бактерии, используют бокс биологической безопасности, если это оговаривается национальным регламентом;

j) при извлечении стерильной пипетки из упаковки не позволяют наконечнику касаться наружных поверхностей пипеток, остающихся в упаковке, потому что такие поверхности могут стать причиной контаминации наконечника;

k) пипетка не должна прикасаться к ободкам или горлышкам колб или флаконов, используемых для разведений.

Аэрозоли — главная причина загрязнения окружающей среды и инфекции. Например, аэрозоли могут формироваться следующим образом:

- при открытии чашек Петри, пробирок и флаконов;
- использовании шейкеров, шприцов, центрифуг и т. д.;
- опорожнении пипеток;
- стерилизации влажных петель и игл;

- открывании ампул, содержащих лиофилизированные культуры.

Таким образом, их формирование необходимо свести к минимуму.

При использовании молекулярных методов необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности в соответствии с ISO 22174.

9.2 Приготовление исходной суспензии и разведений

9.2.1 Общие положения

Исходную суспензию и разведения приготавливают согласно соответствующей части ISO 6887. Интервал времени между моментом окончания приготовления исходной суспензии и моментом инокуляции посевного материала в питательную среду не должен превышать 45 мин, если он специально не оговаривается в соответствующем стандарте.

За этапом приготовления исходной суспензии и получения разведений может следовать этап обогащения в соответствии с конкретными стандартами.

9.2.2 Концентрирование

9.2.2.1 Центрифугирование или фильтрация с помощью мембранного фильтра

Если требуется подсчет малого числа микроорганизмов, подсчет может быть улучшен как с точки зрения чувствительности, так и точности посредством введения дополнительного этапа концентрирования анализируемой пробы. Концентрация при этом может быть достигнута центрифугированием или фильтрацией на мембранных фильтрах.

При использовании центрифугирования полученный осадок повторно растворяют в меньшем объеме растворителя и продолжают исследование.

Для каждой рассматриваемой комбинации (пищевой продукт плюс микроорганизм) (см. например, [23]) необходимо предварительно установить, является ли введение этапа концентрирования необходимым и правомерным. Следует оценить способность к фильтрованию суспензии пищевого продукта.

Необходимо также проверить выполнение этапа концентрирования в отношении чувствительности, селективности, линейности и воспроизводимости. Если уровень загрязнения неизвестен, параллельно необходимо провести исследование стандартным методом (без фильтрации).

9.2.2.2 Иммуноразделение

Если в пробе присутствуют малые количества интересующих микроорганизмов, разделение и концентрирования микроорганизмов может быть достигнута с помощью иммуномагнитных шариков, покрытых специфическими антителами.

Шарики распределяют, вместе с выделенными интересующими микроорганизмами, непосредственно на конкретной плотной питательной среде в соответствии с конкретными нормативными стандартами. Следует проверить, что иммуномагнитные шарики, покрытые специфическими, используемыми на этом этапе концентрирования антителами, удовлетворяют требованиям, определенным при оценочных испытаниях, проведенным согласно методам, опубликованным в международной научной литературе, касающейся, главным образом, микробиологии пищевых продуктов. Эта проверка особенно важна, если этот метод не был утвержден в соответствии с ISO 16140-2.

10 Подсчет

10.1 Общие положения

При оценке микробиологического качества и/или безопасности пищевых продуктов и кормов для животных часто недостаточно только знать, какие микроорганизмы присутствуют в пробе. В большинстве случаев количественный аспект не менее важен, и это требует необходимости подсчета микроорганизмов. Подсчет можно выполнить различными способами: с помощью прямого определения (микроскопия), посевом на плотные или жидкие питательные среды, с помощью проточной цитометрии, в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и т. д. Однако в настоящем стандарте рассматривается только подсчет микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

Подсчет на плотных питательных средах основан на способности многих микроорганизмов образовывать колонии на или в агаровых питательных средах, которые можно распознать невооруженным глазом или с помощью простой лупы.

Однако если матрица содержит много частиц, которые могут повлиять на обнаружение колоний, они должны быть предварительно отделены путем установки или использования рукавов с фильтром.

Если количество бактерий очень мало (менее 10 колоний в или на чашке при минимальном разбавлении), рекомендуется проводить подсчет с использованием жидких сред (например, НВЧ). С целью повышения статистической надежности результатов (см. приложения В и С) также могут быть использованы концентрирование посредством фильтрования, иммуносепарации или центрифугирования.

10.2 Подсчет при использовании плотных питательных сред

10.2.1 Общие положения

Чашка Петри должна быть маркирована этикеткой, на которой указывают номер пробы, разведение, дату посева и другую необходимую информацию.

Необходимо выбрать определенные разведения, чтобы обеспечить получение определенного количества колоний на чашках (см. 10.3.1) и исключить возможные ингибирующие свойства.

Для переноса каждого разведения используют отдельную стерильную пипетку, кроме случаев, когда работу ведут от самого высокого разведения к самым низким разведениям.

Примечание — Данный подпункт приводится для общего случая разведения 10^{-1}, но также допустимы другие виды разведения (например, 1:5 или 1:2).

10.2.2 Количество чашек Петри на каждое разведение

В процедуре подсчета в микробиологии пищевых продуктов обычно используют одну чашку на каждое разведение микроорганизмов с проведением не менее двух последовательных разведений. С целью повышения надежности можно также использовать две чашки на одно разведение.

Если используют только одно разведение, то с целью повышения надежности результатов можно использовать две чашки с данным разведением согласно приложению D.

В лабораториях, которые не применяют принципы обеспечения качества, с целью повышения надежности результатов можно использовать две чашки с одним разведением согласно приложению D.

10.2.3 Методы разливки чашек

Отбирают определенные объемы разведений для исследования, касаясь наконечником пипетки боковой стенки пробирки, чтобы удалить избыточную жидкость с внешней стороны пипетки. Приподнимают крышку стерильной чашки Петри так, чтобы была возможность внесения содержимого пипетки в чашку, после чего содержимое распределяют.

После переноса расплавленной агаровой среды из водяной бани, отирают сухой флакон чистым полотенцем во избежание загрязнения чашек водой. Избегают циркуляции среды на внешней стороне контейнера или на внутренней стороне чашки в процессе ее наполнения. С целью исключить загрязнения среды флакон держат практически горизонтально. Также следует избегать опускание флакона в период между наполнениями. Выливают агаровую среду при температуре 44 °С — 47 °С в каждую чашку Петри (как правило, 18 — 20 $см^3$ агара в чашку Петри диаметром 90 мм, или 45 — 50 $см^3$ агара в чашку Петри диаметром 140 мм для того, чтобы слой среды составлял не менее 3 мм) в течение 15 мин инокуляции (чтобы исключить агрегирование колоний). Необходимо наливать расплавленную среду таким образом, чтобы избежать ее попадания непосредственно в инокулят (посевной материал). Расплавленную среду и инокулят немедленно тщательно перемешивают для получения равномерного распределения микроорганизмов в питательной среде, например, посредством плавных движений чашки взад-вперед, из стороны в сторону и круговых движений. Далее чашки помещают на холодную горизонтальную поверхность, чтобы дать время охладиться и затвердеть питательной среде (время затвердевания агара не должно превышать 10 мин).

Если в исследуемом продукте предполагается присутствие колоний (например, вида Proteus) с «ползучим» ростом, используют для исследования слой со стерильным «голодным» агаром или идентичной питательной средой, наносимые на затвердевший агар в чашки с посеянным материалом (как правило, 5 $см^3$ агара в чашке Петри на 90 $см^3$), чтобы предотвратить или свести к минимуму распространение такого «ползучего» роста.

10.2.4 Поверхностный посев

10.2.4.1 Общие положения

Методы посева, предназначенные для получения только поверхностных колоний на агаровых чашках, имеют некоторые преимущества по сравнению с методом заливки в чашки для выращивания микроорганизмов внутри агара. Морфологию поверхностных колоний легко наблюдать, используя способности оператора различать различные виды колоний. Микроорганизмы не подвергаются действию высокой температуры расплавленной агаровой среды, поэтому количество колоний может быть выше.

Используют предварительно заполненные агаровой средой чашки, толщина агарового слоя которых составляет не менее 3 мм. Слой агара должен быть ровным и не содержать пузырьков воздуха и поверхностной влаги.

Чтобы облегчить равномерное распределение, поверхность затвердевшего агара необходимо подсушить в соответствии с ISO 11133 или в соответствии с другим соответствующим стандартом. В таком случае посевной материал абсорбируют в течение 15 мин.

10.2.4.2 Метод посева с помощью шпателя

С помощью стерильной пипетки инокулят жидкой пробы или исходной суспензии в случае других проб (обычно от 0,1 до 0,5 см^3) переносят на агаровую среду в чашки Петри (диаметром 90 или 140 мм, соответственно). Данную процедуру повторяют для следующего десятичного разведения (колонии, подлежащие подсчету, тогда будут представлены в степени разбавления 10^{-2} в случае материала жидкой пробы и 10^{-2} в случае материала другой пробы) и, при необходимости, повторяют дальнейшие десятичные разведения.

Если необходимо подсчитать незначительное количество микроорганизмов в определенных продуктах, предел обнаружения можно увеличить в десять раз посредством анализа 1,0 см^3 пробы в случае жидких продуктов и 1,0 см^3 исходной суспензии в случае других продуктов. Для этой цели, 1,0 см^3 посевного материала распределяют или по поверхности большой чашки Петри (диаметром 140 мм) или по поверхностям трех обычных чашек Петри (диаметром 90 мм). При использовании только одного разбавления подготавливают дубликаты, используя две большие чашки или шесть малых.

С помощью шпателя, изготовленного из стекла, пластмассы или стали (например, изготовленной из стекла палочки, изогнутой в форме хоккейной клюшки диаметром приблизительно 3,5 мм и длиной 20 см, изгибы выполнены под прямым углом на расстоянии 3 см от одного конца палочки и сплющены на концах с помощью нагревания), распределяют посевной материал, по возможности, быстро и равномерно по поверхности агара, не касаясь боковых стенок чашки Петри. Закрыв чашку крышкой, дают посевному материалу абсорбироваться в течение 15 мин при комнатной температуре.

В определенных случаях (как указано в соответствующем стандарте) посевной материал можно поместить на мембрану и потом распределить по среде, как описано выше.

10.2.4.3 Метод спирального нанесения материала

10.2.4.3.1 Общие положения

Метод спирального нанесения посевного материала для определения уровня содержания микроорганизмов проверен в межлабораторных испытаниях молока и молочных продуктов и других пищевых продуктов.

Используемое оборудование — спиральный дозатор — описан в 5.24.

10.2.4.3.2 Приготовление чашек с агаровой средой

Для приготовления чашек с агаровой средой рекомендуется использовать автоматический дозатор со стерильной системой дозирования, чтобы получить чашки с одинаковым объемом агаровой среды, с целью гарантии, что слои агара ровные, не содержат пузырьков воздуха и стерильные.

Во все чашки наливают одинаковое количество агара таким образом, чтобы под дозирующей иглой спирального дозатора высота слоя агара была одинаковой во всех чашках, и чтобы угол контакта оставался правильным и одинаковым.

Перед использованием чашки высушивают (см. ISO 11133), чтобы на поверхности среды не осталось капель воды.

10.2.4.3.3 Процедура нанесения посевного материала и подсчет

Обеззараживают кончик дозирующей иглы и трубку, обмакнув их в растворе гипохлорита натрия (см. 5.24.4), а затем в стерильную воду через систему, перед тем как втянуть в дозирующую иглу жидкий образец. В качестве альтернативы используют одноразовый микрошприц, если это предусмотрено в оборудовании.

Помещают предварительно разлитую агаровую среду в чашке Петри на поворотный столик и опускают дозирующую иглу. Проба неравномерно распределяется по среде по мере движения кончика иглы по поверхности агаровой среды. Засеянную чашку убирают, а дозирующую иглу возвращают в исходное положение. Иглу обеззараживают или заменяют микрошприц и загружают для посева в другие чашки.

Закрыв чашку крышкой, дают посевному материалу абсорбироваться в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего проводят термостатирование (см. 10.2.5).

После термостатирования на поверхность засеянной агаровой среды в центр чашки помещают специальную сетку для подсчета количества микроорганизмов в чашках, засеянных по спирали. Для определения количества микроорганизмов используют «правило двадцати». Подсчет колоний начинают, выбрав клин и начав подсчет от наружного края первого сегмента по направлению к центру, пока не подсчитают 20 колоний. Процедуру завершают подсчетом в сегменте, содержащем двадца-

тую колонию. На противоположной стороне чашки подсчитывают соответствующий участок и делят число колоний, подсчитанных по обе стороны, на объем образца, нанесенный на два данных участка. Объемы образца, соответствующие каждой части счетной сетки, приведены в инструкциях, которые прилагаются к каждому спиральному дозатору.

10.2.5 Термостатирование

Если в соответствующих стандартах нет специальных оговорок, чашки после посева незамедлительно переворачивают и быстро помещают в термостат с установленной соответствующей температурой. Если происходит интенсивное обезвоживание (например, при 55 °С или в случае интенсивной циркуляции воздуха), чашки перед термостатированием неплотно укладывают в пластиковые пакеты или используют сходную систему равной эффективности.

Во время термостатирования неизбежно происходят незначительные колебания температуры, например, во время типичных операций загрузки и разгрузки термостата, но важно, чтобы такие периоды занимали минимальное время. Продолжительность таких операций рекомендуется отслеживать, чтобы не допустить их заметного влияния на результат.

В определенных обстоятельствах желательно поместить засеянные чашки в холодильник не более чем на 24 ч перед термостатированием. Если это используется, лаборатория должна гарантировать, что подобная практика не влияет на результат подсчета.

Обычно чашки Петри составляют друг на друга, не более шести штук в стопке при аэробной инкубации. Стопки следует ставить друг от друга и от стенок термостата на расстоянии не менее 25 мм. Однако в термостатах, оснащенных системой циркуляции воздуха, высота стопок может быть больше, а расстояние между ними меньше; однако в этом случае необходимо проверять равномерность распределения температуры в термостате.

После термостатирования чашки следует немедленно исследовать. Однако их можно хранить, если нет иных указаний в соответствующих стандартах, до 48 ч в холодильнике. Хранение в холодильнике допускается только в случаях, если показано, что оно не влияет на количество искомых микроорганизмов, внешний вид или последующую идентификацию колоний. Охлажденные чашки с некоторыми средами, содержащими индикаторные красители, рекомендуется привести в равновесие с условиями окружающей среды при комнатной температуре перед исследованием, чтобы обеспечить восстановление правильной окраски.

10.3 Расчеты и выражение результатов, полученных на плотных средах

10.3.1 Подсчет колоний

После термостатирования, установленного соответствующим стандартом на конкретный метод испытания, посчитывают количество колоний (общее число колоний, число типичных колоний или предполагаемых колоний) на каждой чашке, содержащей не более 300 колоний (или другого количества, установленного соответствующим стандартом на конкретный метод испытания).

При подсчете типичных или предполагаемых колоний необходимо представить описание колоний, которое дано в соответствующем стандарте на конкретный метод испытания.

В определенных случаях подсчет колоний может быть затруднен (например, когда присутствуют распространяющие «ползучий рост» микроорганизмы). Такие сливные колонии рассматривают как отдельные колонии. Если менее четверти чашки заполнено таким сливным ростом, колонии подсчитывают на другой части чашки и рассчитывают посредством интерполяции теоретическое число, которое должно соответствовать числу микроорганизмов на всей чашке. Если сливной рост отмечается более чем на одной четверти чашки, то подсчет на такой чашке не проводится. Колонии сливных (распространяющихся) микроорганизмов, выросших в форме цепочек, рассматривают как одну колонию.

Примечание — В определенных случаях желательно создать условия для хранения засеянных чашек при температуре (3 ± 2) °С для использования при сравнении с термостатированными засеянными чашками при подсчете, чтобы избежать исследования мешающих частиц продукта при исследовании колоний. Для различения частиц продукта от колоний можно также использовать бинокулярное увеличительное стекло.

Различные методы расчетов приведены в 10.3.2, приложениях B и D. В них учитываются особые случаи и приводится информация о доверительных интервалах.

В различных методах расчетов необходимо принять во внимание чашки, не содержащие колоний, если такие чашки имеются, поскольку при расчете средневзвешенных величин это является важным.

При использовании спирального дозатора подсчет колоний проводят в соответствии с 10.2.4.3.3.

10.3.2 Обработка результатов

10.3.2.1 Общие положения

10.3.2.1.1 В этом подразделе рассматриваются общие случаи:

- посев проводят на одной чашке Петри диаметром 90 мм для каждого разведения и выполняют, по меньшей мере, два последовательных разведения;
- максимальное количество всех присутствующих колоний на чашке составляет 300;
- максимальное общее число колоний (типичных и атипичных), присутствующих на чашке, при подсчете типичных или презумптивных колоний приблизительно равно 300 на чашку;
- максимальное число типичных или презумптивных колоний равно 150 на чашку;
- число презумптивных колоний, отобранных для идентификации или подтверждения (см. 10.3.2.3), в каждой выбранной чашке обычно равно 5.

Такие цифры определены в соответствующих стандартах на конкретный метод испытания. Для микроорганизмов, дающих рост больших колоний, максимальное количество колоний на чашке установлено в соответствующем стандарте.

Если используются чашки с другим диаметром, отличным от 90 мм, максимальное число колоний должно возрастать или уменьшаться пропорционально площади поверхности чашки (или мембраны).

Примеры

– Для засеянных чашек диаметром 55 мм максимальное подсчитываемое число колоний должно быть 110 (что эквивалентно общему количеству 300 КОЕ на чашке Петри диаметром 90 мм).

– Для чашки диаметром 140 мм максимальное подсчитываемое число колоний должно быть 730 (что эквивалентно общему количеству 300 КОЕ на чашке Петри диаметром 90 мм).

10.3.2.1.2 Методы расчета, приведенные ниже, применяются для тех случаев, которые встречаются наиболее часто, когда исследования проводят в соответствии с установившейся лабораторной практикой. Могут встречаться особые случаи (например, отношение коэффициентов разведения, использованное для двух последующих разведений, может значительно отличаться), и именно поэтому необходимо, чтобы полученные результаты подсчета изучал и трактовал квалифицированный микробиолог и, при необходимости, не учитывал недостоверные результаты.

10.3.2.2 Метод расчета: общий случай (подсчет общего количества колоний или типичных колоний)

Для получения достоверного результата при подсчете колоний обычно считается необходимым, чтобы хотя бы в одной чашке содержалось не менее 10 колоний [общее число колоний, типичных колоний или колоний, соответствующих критериям идентификации (см. 10.3.2.3)].

Рассчитывают число N микроорганизмов, присутствующих в пробе, как средневзвешенное значение из двух подсчетов в последовательных разведениях по формуле

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot 1,1 \cdot d}, \qquad (1)$$

где ΣC — сумма колоний, подсчитанных на двух чашках, выбранных для подсчета из двух последовательных разведений, в которых хотя бы одна чашка содержит не менее 10 колоний;

V — объем посевного материала, внесенного в каждую чашку, см^3;

d — коэффициент разведения, соответствующий первому выбранному разведению [$d = 1$, если выбран только неразведенный жидкий продукт (исследуемая проба без разбавления)].

Если используют более одного разведения, соотношение между подсчетом колоний разведения d_2 и подсчетом колоний разведения d_1 должно быть 10 %. Верхний и нижний пределы должны быть установлены лабораторией для подсчета колоний разведения d_2. Эти пределы могут быть, например, пределами, которые установлены в [42]. В случае, когда данные пределы не учитываются, результаты следует интерпретировать с осторожностью.

Пример — Если подсчет колоний разведения d_1 дал результат 250, подсчет колоний разведения d_2 должен показать результат не менее 13 (5,2 %) и не более 39 (15,6 %). См. [42].

Результат вычисления округляют до двух значащих цифр. Если третья цифра меньше пяти, предшествующую цифру не изменяют, если третья цифра больше или равна пяти, увеличивают предшествующую цифру на единицу.

Результат выражают предпочтительно как число от 1,0 до 9,9, умноженное на 10 в соответствующей степени, или целым числом, состоящим из двух значащих цифр.

За результат принимают количество *N* микроорганизмов на кубический сантиметр (жидких продуктов) или на грамм (прочих продуктов).

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- В первом выбранном разведении (10^{-2}): 168 колоний;

- Во втором выбранном разведении (10^{-3}): 14 колоний.

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot 1,1 \cdot d} = \frac{168 + 14}{1 \cdot 1,1 \cdot 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16545 \cdot$$

Выполнив округление результатов в соответствии с вышеописанным, получаем число микроорганизмов, равное 17000 или $1,7 \cdot 10^4$ на кубический сантиметр или на грамм продукта.

10.3.2.3 Метод вычисления: после проведения идентификации

Если используемый метод требует идентификации, определенное количество *A* предполагаемых колоний (обычно пять) пересеивают с каждой чашки, отобранной для подсчета колоний. После идентификации рассчитывают для каждой чашки число *a* колоний, соответствующих критерию идентификации по формуле

$$a = \frac{b}{A} C, \tag{2}$$

где *b* — число колоний, соответствующих критериям идентификации, среди идентифицированных колоний *A*;

C — общее число предполагаемых колоний, подсчитанных в чашке.

Результат вычисления округляют до целого числа. Для этого, если первая цифра после запятой меньше пяти, предшествующую цифру не изменяют, если первая цифра после запятой больше или равна пяти, предшествующую цифру увеличивают на единицу.

Количество *N*, N_E, *N'* идентифицированных или подтвержденных микроорганизмов, присутствующих в исследуемой пробе, рассчитывают путем подстановки вместо ΣC значения Σa в формуле, приведенной в 10.3.2.2, или путем подстановки *a* вместо *C* в формуле, приведенной в 10.3.2.4.1 и 10.3.2.5.3. Результаты округляют, как описано в 10.3.2.2.

Результаты выражают, как описано в 10.3.2.2, 10.3.2.4.1 и 10.3.2.5.3, соответственно.

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- в первом разведении (10^{-3}): 66 колоний;

- во втором разведении (10^{-4}): 4 колонии.

Тестирование отобранных колоний было выполнено следующим образом:

- из чашки с 66 колониями для идентификации было отобрано восемь колоний, из которых шесть колоний соответствовали критериям, следовательно, *a* = 50;

- из чашки с четырьмя колониями все четыре соответствовали критериям, следовательно, *a* = 4.

$$N = \frac{\Sigma a}{V \cdot 1,1 \cdot d} = \frac{50 + 4}{1 \cdot 1,1 \cdot 10^{-3}} = \frac{54}{1,1 \cdot 10^{-3}} = 49090.$$

Округление результата выполняют в соответствии с 10.3.2.2, количество микроорганизмов в пробе составило 49000 или $4,9 \times 10^4$ на кубический сантиметр или на грамм продукта.

10.3.2.4 Метод вычисления: малые количества

10.3.2.4.1 Одна чашка (анализируемой пробы или исходной суспензии или первого разведения) содержит менее десяти колоний.

Число микроорганизмов от десяти до значения верхнего предела каждого метода находится в диапазоне оптимальной точности. Однако точность быстро уменьшается по мере уменьшения числа колоний менее десяти. Тем не менее, в зависимости от цели исследования нижний предел можно определить в соответствии с представленным ниже для количеств менее десяти.

Согласно [40] определение предела обнаружения будет таким: «Наименьшая средняя концентрация частиц *x* в образце для исследования (навеске), если ожидаемая относительная стандартная неопределенность равна установленному значению (RSD)». Термин «коэффициент вариации» в настоящее время более предпочтителен, чем RSD. Коэффициент вариации, C_V вычисляют путем деления стандартного отклонения *s* для популяции образца на среднее $\overline{x}$ для этого образца. Таким образом, $C_V = s/\overline{x}$.

В случае распределения Пуассона x вычисляют по формуле

$$x = \frac{1}{C_V^2} \ . \qquad (3)$$

Если C_V установлено при 50 % как предел приемлемой относительной точности (которая считается разумной в микробиологии), нижний предел определения будет при числе колоний, вычисляемых по формуле:

$$x = \frac{1}{0{,}50^2} = 4 \ .$$

Таким образом, результаты, основанные на количестве меньше четырех, следует оценивать как простое выявление присутствия искомого микроорганизма.

Вывод: Если в чашке содержится менее десяти колоний, но не менее четырех, результат вычисляют по формуле

$$N_E = \frac{C}{V \cdot d}$$

и принимают за результат вычисленное количество N_E микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм продукта (для прочих продуктов).

Примечание — Термин «оцениваемое количество» означает менее точную оценку истинного значения.

Если общее число составит от одного до трех, точность результата будет слишком низкой, и результат необходимо сообщать следующим образом:

«Микроорганизмы присутствуют в количестве менее чем 4/Vd на грамм или кубический сантиметр».

10.3.2.4.2 Чашка (анализируемый образец или исходная суспензия, или первое разведение) не содержит колоний

Если чашка с анализируемой пробой (для жидких продуктов) или исходной суспензией (для прочих продуктов) или отобранная из чашек, засеянных материалом первого разведения, не содержит колоний, результат сообщают следующим образом:

«менее 1/Vd микроорганизмов на кубический сантиметр» (для жидких продуктов) или «менее 1/Vd микроорганизмов на грамм» (для прочих продуктов),

где d – коэффициент разбавления исходной суспензии или первого засеянного или отобранного разведения ($d = 10^0 = 1$, если отбирается непосредственно посеянная анализируемая проба жидкого продукта).

V – объем инокулята, используемого в каждой чашке, в кубических сантиметрах.

10.3.2.4.3 Особые случаи

10.3.2.4.3.1 Общие положения

Эти случаи касаются подсчета типичных и предполагаемых колоний.

10.3.2.4.3.2 Случай 1

Если число типичных и атипичных колоний для чашки с первым разведением d_1 превышает 300 (или какое-либо другое число, установленное в соответствующем стандарте на конкретный метод испытания) с выявленными типичными колониями или подтвержденными колониями, и если чашка, содержащая последующее разведение d_2 содержит не более 300 колоний (или не более любого другого числа, оговоренного в соответствующем стандарте), и не наблюдается типичных или подтвержденных колоний, результат сообщают следующим образом:

«Менее $1/V_2d_2$ и более $1/V_1d_1$ микроорганизмов на кубический сантиметр» (для жидких продуктов) или

«менее $1/V_2d_2$ и более $1/V_1d_1$ микроорганизмов на г» (для прочих продуктов),

где d_1 и d_2 — коэффициенты разбавления, соответствующие разведениям d_1 и d_2;

V_1 — объем инокулята, используемый в чашке при первом разведении d_1, в кубических сантиметрах;

V_2 — объем инокулята, используемый в чашке при последующем разведении d_2, в кубических сантиметрах.

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 300 колоний на чашку, среди которых присутствуют типичные или подтвержденные колонии;

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 33 колонии, среди которых присутствуют типичные или подтвержденные колонии.

Результат в пересчете на микроорганизмы будет от 100 до 1000 на кубический сантиметр или на грамм продукта.

10.3.2.4.3.3 Случай 2

Если количество типичных и атипичных колоний в чашке с первым разведением d_1 превышает 300 (или какое-либо другое число, установленное в соответствующем стандарте), среди которых типичных или подтвержденных (идентифицированных) колоний не наблюдается, и если в чашке, содержащей последующее разведение d_2, выявлено не более 300 колоний (или какого-либо другого числа, установленного в соответствующем стандарте) и не выявлено типичных или подтвержденных (идентифицированных) колоний, результат сообщают следующим образом:

«менее $1/V_2d_2$ микроорганизмов на кубический сантиметр» (для жидких продуктов) или «менее $1/V_2d_2$ микроорганизмов на г» (для прочих продуктов),

где d_2 — коэффициент разбавления, соответствующий разведению d_2;

V_2 — объем инокулята, используемый в чашке при последующем разведении d_2, в кубических сантиметрах.

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 300 колоний на чашку, среди которых нет типичных или подтвержденных колоний;

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) 33 колонии, среди которых нет типичных или подтвержденных колоний.

Результат в пересчете на микроорганизмы будет меньше 1000 на кубический сантиметр или на грамм продукта.

10.3.2.5 Метод вычисления: особые случаи

Примечания

1 Некоторые примеры могут не соответствуют правилам, приведенным в 10.3.2.2, которые устанавливают верхний и нижний пределы подсчета колоний разведения d_2 по сравнению с результатами для разведения d_1. В случае, если проведение повторного исследования невозможно или является неподходящим, результаты можно рассчитать и выразить в соответствии с 10.3.2.2, однако точность будет ниже, чем в случае обычной ситуации; это должно быть отражено в протоколе испытаний.

2 Все объяснения и примеры приведены для случая, когда используют одну чашку Петри на разведение. Случай, когда используют две чашки Петри на разведение, описан в приложении D.

3 Нижние пределы подсчета колоний для разведения d_2, приведенные в примерах, установлены в [42].

4 Значения для доверительного интервала должны быть адаптированы для максимального числа, установленного для подсчета колоний.

10.3.2.5.1 Если число подсчитанных колоний (общее число колоний, число типичных колоний или число предполагаемых колоний) выше максимального подсчитываемого числа (равного 300 или какого-либо другого числа, установленного в соответствующем стандарте) для чашки с первым разведением d_1, а число колоний (общее, типичных колоний или колоний, соответствующих критериям идентификации) для чашки со вторым последующим разведением d_2 менее 10 (нижний предел подсчета), то результат выражают следующим образом:

Примечание — Данные пункты настоящего подраздела приведены в качестве примеров.

а) если число колоний для чашки с первым разведением d_1 попадает в интервал 301 — 334 (максимальное подсчитываемое число плюс 1, верхний предел доверительного интервала для максимального подсчитываемого числа) (приложение В) и подсчет колоний для разведения d_2 дал результат не менее чем нижний предел, установленный в 10.3.2.2, используют метод вычисления для общих случаев (см. 10.3.2.2).

Пример 1 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 300, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено 310 колоний (меньше чем 334, верхнего предела доверительного интервала для 300);

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 8 колоний. Нижний предел для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 18 колоний, установлен на основе 310 колоний разведения (10^{-2}).

Результат, полученный при данном подсчете колоний, неприемлем.

Пример 2 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 150, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено 160 колоний (меньше чем 174, верхнего предела доверительного интервала для 150);

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 8 колоний. Нижний предел для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 7 колоний, установлен на основе 160 колоний разведения (10^{-2}).

Используют метод вычисления для общих случаев (10.3.2.2), используя отобранные чашки для двух разведений.

b) если число колоний для чашки с первым разведением d_1 превышает верхний предел доверительного интервала для максимального подсчитываемого количества (например, 334) и подсчет колоний для разведения d_2 дал результат не менее чем нижний предел, установленный в 10.3.2.2 и рассчитанный на основе верхнего предела доверительного интервала для максимального подсчитываемого количества, учитывают только результат подсчета для разведения d_2 и проводят примерный подсчет (см. 10.3.2.4.1).

Пример 1 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 300, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 334 колоний в чашке;

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 9 колоний. Нижний предел для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 20 колоний, установлен на основе 334 колоний разведения (10^{-2}).

Результат, полученный при данном подсчете колоний, неприемлем.

Пример 2 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 150, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 174 колоний в чашке;

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 9 колоний. Нижний предел для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 8 колоний, установлен на основе 174 колоний разведения (10^{-2}).

Оцененное число колоний записывают на основе колоний, подсчитанных на чашке для разведения (10^{-3}) (см. 10.3.2.4.1).

Пример 3 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 150, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 174 колоний в чашке;

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 5 колоний. Нижний предел для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 8 колоний, установлен на основе 174 колоний разведения (10^{-2}).

Результат, полученный при данном подсчете колоний, неприемлем.

10.3.2.5.2 Если количество подсчитанных колоний (общее количество колоний, количество типичных колоний или количество презумптивных колоний) для каждой из чашек всех посеянных разведений дает значение свыше 300 (или любого другого числа, установленного в соответствующем стандарте), результат формулируют следующим образом:

«Более $300/Vd$» (в случае общего числа или числа типичных колоний) или «Более $(300/Vd) \cdot (b/A)$ (в случае подтвержденных (идентифицированных) колоний), выраженных в количестве микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов),

где d — коэффициент разбавления последнего посеянного разведения;

V — объем инокулята, используемого в каждой чашке, в кубических сантиметрах;

b — число колоний, соответствующих критериям идентификации среди презумптивных колоний A.

10.3.2.5.3 Если чашка с последним засеянным разведением содержит от 10 до 300 колоний (или любое другое количество, установленное в конкретном стандарте) — общее количество колоний, количество типичных колоний или количество презумптивных колоний — число N' присутствующих микроорганизмов вычисляют по формуле

$$N' = \frac{c}{V \cdot d}, \quad (4)$$

где c — число колоний, подсчитанных в чашке;

V — объем посевного материала, использованный для каждой чашки, в кубических сантиметрах;

d — выбранное разведение (коэффициент разбавления).

Результат округляют в соответствии с 10.3.2.2.

За результат принимают число N' микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов).

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- в последнем засеянном разведении (10^{-4}) 120 колоний.

Таким образом,

$$N = \frac{120}{1 \cdot 10^{-4}} = 1200000 \cdot$$

Округление результата проводят в соответствии с 10.3.2.2, число N микроорганизмов равно 1 200 000 или $1{,}2 \times 10^6$ на кубический сантиметр или на г.

10.3.2.6 Измерение неопределенности

См. ISO 19036 в отношении количественных определений.

10.4 Подсчет колоний дрожжей и плесеней

10.4.1 Общие положения

Подсчет колоний дрожжей и плесеней обычно проводят либо методом разливки сред, который позволяет облегчить задачу, либо методом подсчета при поверхностном посеве, который обеспечивает максимальное воздействие на клетки со стороны атмосферного кислорода и позволяет избежать теплового воздействия от расплавленного агара. Предварительно разлитый по чашкам агар перед посевом рекомендуется подсушить (см. ISO 11133).

Некоторые дрожжи и плесени могут вызывать инфекционные заболевания или аллергические реакции даже у здоровых людей. В связи с этим необходимо проявлять особую осторожность при работе с ними. Оптимальным вариантом является хранение чашек в термостате, а не в открытом помещении. Крышки с чашек рекомендуется снимать только в случае крайней необходимости, обычно только при приготовлении предметных стекол для исследования под микроскопом. Перед переносом материала прокаленные иглы необходимо остудить, чтобы избежать рассеивания конидий и других клеток. Рабочие столы и термостаты следует регулярно дезинфицировать.

Чашки Петри следует инкубировать в перевернутом положении и не трогать, пока на чашках не вырастет посевной материал для подсчета колоний. Это связано с тем, что перемещение чашек может приводить к освобождению конидий или спор плесени и последующему появлению колоний-спутников, приводя к повышенному подсчету популяции дрожжей и плесени.

10.4.2 Подсчет колоний дрожжей и плесеней

Для подсчета берут чашки, содержащие от 10 до 150 колоний. Если флора микроорганизмов состоит преимущественно из плесеней, выбирают чашки, в которых количество колоний ближе к нижней границе интервала; если флора микроорганизмов состоит преимущественно из дрожжей, для подсчета выбирают чашки, в которых количество колоний ближе к верхней границе интервала.

Если идентичность колоний вызывает сомнения, исследуют живые препараты или окрашенные препараты клеток, не менее пяти колоний на образец, чтобы подтвердить, что бактерии отсутствуют.

10.5 Подсчет при использовании жидких сред

10.5.1 Принцип

Пробы для анализа высевают в жидкую среду, предназначенную для поддержки роста конкретного микроорганизма или группы микроорганизмов и часто для подавления размножения прочих микроорганизмов.

Чтобы определить, происходит ли рост искомых микроорганизмов, можно использовать различные критерии, например, визуальное обследование помутнения, выделение газа, изменение цвета, последующее выделение микроорганизмов на селективной агаризованной среде в определенных условиях температуры и атмосферы инкубирования. Состав питательной среды и критерии для выявления различий положительного и отрицательного результата определены в соответствующих стандартах.

Используя подобный подход, каждый образец для анализа может быть описан только качественно, значение, т.е. результат оценивается как положительный или отрицательный. Чтобы установить количество присутствующих микроорганизмов, необходимо исследовать несколько проб для анализа, начальных суспензий и разведений и использовать статистические методы для определения наиболее вероятного числа (НВЧ).

10.5.2 Посев

10.5.2.1 Общие положения

Если используют селективную питательную среду, добавление образца для анализа не должно уменьшать селективных свойств этой среды, тем самым способствуя росту прочих микроорганизмов. В большинстве стандартов информация о совместимости определенных образцов и жидкой среды описана в области их применения. Необходимо с осторожностью подходить к таким образцам, как специи, какао, бульон и т.д., поскольку они могут содержать подавляющие рост микроорганизмов вещества, в связи с чем требуют добавления нейтрализующих веществ, применения более высоких коэффициентов разведения, центрифугирования, фильтрования или иммуномагнитной сепарации для выделения искомых микроорганизмов из образца, даже если это специально не оговорено в соответствующих стандартах. Несовместимость может также быть вызвана биологическим составом образца: сильно загрязненные от окружающей среды пробы, ферментированные продукты или продукты, содержащие пробиотики, очевидно представляют большие проблемы микробиологу-аналитику, чем пробы, которые содержат очень незначительное количество микроорганизмов. Для таких проблемных образцов рекомендуется выполнять эксперименты, используя контрольные микроорганизмы, чтобы подтвердить, что метод действительно подходит для анализа данного образца.

При использовании метода НВЧ при анализе твердых проб, в том числе порошкообразных, для подготовки исходной суспензии отбирают только одну пробу. Для анализа данной исходной суспензии используют аликвоты.

10.5.2.2 Проведение анализа

Если в соответствующих стандартах нет иных указаний, объемы образцов для анализа, равные или меньше 1 см^3, обычно добавляют к объему сред обычной концентрации, в 5 — 10 раз превышающему объем пробы для анализа. Пробы для анализа объемом от 1 см^3 до 100 см^3 обычно добавляют к равным объемам сред двойной концентрации.

Для объемов, превышающих 100 см^3, допускается использовать более концентрированные среды. Для особых целей стерильную обезвоженную среду можно растворить в холодном (или предварительно нагретом до 30 °С) образце, подлежащем анализу.

Если нет иных указаний, время, прошедшее с момента приготовления первого разведения пробы и момента засева последней пробирки, многолуночного планшета или флакона, должно составлять менее 30 мин.

10.5.3 Выбор способа посева

Сущность метода наиболее вероятного числа заключается в разбавлении пробы до такой степени, чтобы посевной материал не всегда содержал живые микроорганизмы. По «выходу», т. е. по количеству посевного материала, дающему рост в каждом разведении, будет оцениваться начальная концентрация бактерий в пробе. Чтобы получить оценку в широком диапазоне возможных концентраций, микробиологи используют серийные разведения, инкубируя в термостате по несколько пробирок (или чашек и пр.) каждого разведения. НВЧ микроорганизмов, присутствующих на уровне исходной пробы, и точность оценки можно рассчитать с помощью статистических методов на основе числа положительных и отрицательных пробирок, полученных после инкубации в термостате.

Осуществляют выбор НВЧ из различных существующих конфигураций в соответствии:

- с ожидаемым числом микроорганизмов в анализируемой пробе,
- требованиями регламентов,
- требуемой точностью и
- другими практическими соображениями.

Неопределенность измерения зависит от числа положительных образцов для анализа, наблюдаемых практически одинаковым образом, поскольку неопределенность подсчета колоний зависит от числа колоний в чашке. Неопределенность измерения изменятся как функция корня квадратного из числа использованных пробирок, поскольку точность возрастает вместе с увеличением числа повторных испытаний. Число пробирок необходимо увеличить в четыре раза для того, чтобы неопределен-

ность измерения уменьшилась вдвое. Если используют способы только с небольшим числом дублируемых пробирок, неопределенность измерения высокая.

В зависимости от размера образец для анализа можно засевать в пробирки или флаконы, содержащие требуемое количество жидкой среды. Для образцов небольшого объема можно использовать также многолуночные планшеты.

10.5.3.1 Способ одного разведения

Если ожидаемая концентрация микроорганизмов невелика или ожидается ее умеренное изменение, наиболее подходящим способом посева будет одна серия равных проб для анализа. Там, где ожидаемое соотношение между максимальным и минимальным количеством микроорганизмов менее 25, десять параллельных проб для анализа является наименьшим числом для получения необходимых результатов; для 50 параллельных пробирок соотношение 200 является предельным. В случае, когда фактическая концентрация достигает максимального значения НВЧ, вероятность того, что во всех пробирках будет наблюдаться рост или отсутствие роста, будет слишком высокой. Примеры НВЧ для одного разведения приведены в таблицах С.1 — С.4.

10.5.3.2 Способ нескольких разведений

Если концентрация микроорганизмов в пробе неизвестна или предполагается ее значительное изменение, может потребоваться посев на серии пробирок из нескольких разведений. Высевают достаточное число разведений, чтобы обеспечить исследование как с положительными, так и с отрицательными результатами. Число разведений также зависит от метода вычисления, используемого для оценки значения НВЧ. Если требуется применение таблиц, то используют конфигурации способов, представленные в таблицах. При использовании компьютерных программ число разведений и параллельных пробирок не ограничивается, что очень важно с точки зрения использования новых коммерческих тест-наборов для НВЧ.

10.5.3.3 Симметричный способ посева

В наиболее часто применяемом симметричном способе посева для определения НВЧ используют три или пять параллельных пробирок на разведение. Точность, получаемая при применении этого способа, резко уменьшается по мере уменьшения числа пробирок на разведение. Результаты с использованием трех пробирок являются не более чем показателями порядка значения концентрации. Если требуется более высокая точность, рекомендуется использовать пять или больше параллельных пробирок. Примеры определения НВЧ с использованием трех, пяти и десяти пробирок приведены соответственно в таблицах С.5, С.6 и С.7.

10.5.3.4 Асимметричный способ

В асимметричных способах используют разное количество пробирок в разных разведениях. Применение таких способов пригодно только для оценки количества микроорганизмов в четко заданном диапазоне. (см. примеры в ISO 8199).

В случае неосторожности пробирка может быть утеряна или разбита, что приведет к необходимости использовать асимметричный способ. Однако некоторые коммерческие тест-наборы предназначены для асимметричных способов. Для оценки данных, полученных на основе асимметричных способов, рекомендуется использовать надлежащее программное обеспечение (см. 10.5.6.3).

10.5.4 Термостатирование

Засеянные пробирки, колбы и флаконы инкубируют в термостате или в водяной бане. Многолуночные планшеты помещают в термостат.

Выбирают продолжительность и температуру инкубации, получив информацию в соответствующем стандарте на конкретный метод испытания, поскольку эти параметры зависят от типа рассматриваемого микроорганизма или группы микроорганизмов.

Для некоторых микроорганизмов может потребоваться термостатирование в два этапа или этап подтверждения. Для получения дополнительной информации см. соответствующие стандарты, но следует иметь в виду, что в этом случае возникают дополнительные трудности с расчетом величины НВЧ (см. ссылку [52]).

10.5.5 Интерпретация результатов

Критерии дифференциации положительных и отрицательных результатов различны для каждого типа микроорганизма или группы микроорганизмов и определяются в соответствующих стандартах. Используя эти критерии, подсчитывают и записывают число положительных результатов, полученных во всех образцах для анализа, взятых из одной лабораторной пробы.

10.5.6 Определение значений НВЧ

Существует три различных способа определения значения НВЧ: вычисление по математическим формулам, сопоставление с таблицами НВЧ или применение специальных компьютерных программ. При условии, что эти методы основаны на одних и тех же статистических допущениях, все эти варианты в равной степени достоверны. Эти три метода описаны ниже.

10.5.6.1 Математический метод

10.5.6.1.1 Приблизительные формулы для всех случаев

Приблизительные значения НВЧ (М) для любого числа разведений и параллельных пробирок получают путем применения следующей формулы (5):

$$\text{M/g} = \frac{Z_p}{\sqrt{m_s \cdot m_t}}, \quad (5)$$

где Z_p — число положительных пробирок;

m_s — общая масса пробы во всех пробирках с отрицательной реакцией, в граммах;

m_t — общая масса пробы во всех пробирках, в граммах.

Пример [53]

Допустим, что при испытании 10 проб, каждая из которых имеет массу 0,1, 0,01 и 0,001 г, и определяют 10, 4 и 2 положительных результата. Тогда для получения только фракционных результатов (т. е. 4 и 2) общее количество положительных результатов равно $Z_p = 6$. Общая анализируемая масса равна: $m_t = 10 \cdot 0{,}01 + 10 \cdot 0{,}001 = 0{,}11$ г; а общая масса в отрицательных пробирках равна $m_s = 6 \cdot 0{,}01 + 8 \cdot 0{,}001 = 0{,}068$ г.

$$M \text{ / g} = \frac{6}{\sqrt{0{,}068 \times 0{,}11}} = \frac{6}{\sqrt{0{,}007\,5}} = \frac{6}{0{,}086\,5} = 69{,}4\,.$$

Данный результат вполне близок к табличному значению для 10–4–2, когда НВЧ на грамм равно 70.

10.5.6.1.2 «Точное» решение для серии пробирок

Значение НВЧ (М) для простой серии пробирок получают по формуле (6):

$$M \text{ / g} = -\frac{1}{m} \ln\left[\frac{S}{N}\right], \quad (6)$$

где m – масса пробы в каждой пробирке серии, в граммах;

ln – натуральный логарифм;

N – количество пробирок в серии;

S – количество пробирок с отрицательной реакцией.

10.5.6.1.3 Показатели прецизионности для анализа одного разведения

Пределы доверительного интервала, при уровне вероятности 95 %, оценки НВЧ можно рассчитать приблизительно из полученного НВЧ и стандартного отклонения $\log_{10} M$, используя процедуру, описанную в ссылке [55], как это писано в [53] — см. также [52].

Примечание – В соответствии с [57], разделом 12, символ, используемый для обозначения десятичного логарифма – «lg». Вместе с тем, в настоящем стандарте предпочтительно используется обозначение «$\log_{10}$», которое широко распространено в сфере лабораторий пищевой микробиологии.

Стандартную ошибку НВЧ $s_{\log_{10} M}$ рассчитывают по формуле (7)

$$s_{\log_{10} M} = \frac{1 - \exp(-Mm)}{2{,}303 \cdot Mm\sqrt{G\exp(-Mm)}}, \quad (7)$$

где M — НВЧ;

m — масса инокулята на пробирку;

G — количество пробирок, показавших рост;

exp — экспоненциальный множитель.

Нормальную аппроксимацию к доверительным пределам рассчитывают по формуле

$$M \pm 1{,}96\, s_{\log_{10} M}.$$

Пример — Допустим, что 0,1 г пробы (m) было засеяно в каждую из n=20 пробирок, и имеется G = 4 положительных результата (таким образом, число негативных результатов — 16). Значение НВЧ (M) на грамм вычисляют следующим образом:

$$M = -\frac{1}{m}\ln\left(\frac{S}{N}\right) = -\frac{1}{0,1}\cdot\ln\left(\frac{16}{20}\right) = -10\cdot\ln(0,8) = 2,23$$

и стандартную ошибку вычисляют следующим образом:

$$s_{\log_{10}M} = \frac{1-\exp(-Mn)}{2,303\cdot Mn\sqrt{G\exp(-Mn)}}$$

$$= \frac{1-\exp(-0,223)}{2,303\cdot 0,223\sqrt{4\ \exp(-0,223)}}$$

$$= \frac{(1-0,80)}{0,513\,6\cdot\sqrt{3,2}} = \frac{0,20}{0,918\,7} = 0,22$$

Далее, $\log_{10}$ M = 0,35 и нормальную аппроксимацию к доверительным пределам вычисляют по формуле $M \pm 1,96\, s_{\log_{10}M}$.

Нижний предел $\log_{10}$ M равен 0,35 – (1,96 · 0,22) = 0,35 – 0,43 = –0,08.

Верхний предел $\log_{10}$ M равен 0,35 + 0,43 = 0,78.

Таким образом, нижний предел M равен antilog$_{10}$(–0,08) = 0,82, и верхний предел M равен antilog$_{10}$ (0,78) = 6,1.

Тем не менее, нет необходимости проводить данные вычисления вручную, так как данные величины могут быть определены при использовании калькулятора НВЧ (10.5.6.3).

10.5.6.1.4 Показатели прецизионности для анализов симметричных множественных разведений

Десятичный логарифм стандартного отклонения способа вычисления НВЧ симметричного множественного разведения может быть получен из приближенной формулы (8) Кохрана [28]:

$$s = 0,58\sqrt{\frac{\log_{10} f}{N}}, \qquad (8)$$

где s — стандартное отклонение десятичного логарифма НВЧ;

f — коэффициент разбавления, проводимого при переходе от одного разведения к другому (как правило, равен 10);

N — число пробирок на разведение.

Верхний и нижний 95 %-ные пределы можно оценить путем умножения и деления примерного значения НВЧ на антилогарифм 2s. Данная операция может привести к завышению верхнего доверительного предела. Более точная оценка может быть получена при использовании калькулятора НВЧ (10.5.6.3).

10.5.6.2 Таблицы НВЧ

10.5.6.2.1 Таблицы для одного разведения

Таблицы С.1 — С.4 дают значения НВЧ и 95 %-ные доверительные интервалы на образец для анализа для 10, 15, 20 и 25 параллельных пробирок [при этом предполагается, что каждая пробирка засеяна одинаковым объемом материала (одного) разведения].

Чтобы подсчитать итог на контрольную массу образца (или объем для жидких образцов), умножают НВЧ и предельные значения 95 %-ного доверительного интервала на отношение (контрольная масса)/(масса пробы для анализа). Нельзя умножать на логарифмическую стандартную неопределенность. За контрольную массу в микробиологических исследованиях обычно берут 1 г. Масса образца для анализа соответствует количеству образца (в граммах), которое представлено в объеме, использованном для засева пробирок, т. е. 0,1 г в случае использования 1 см^3 гомогената с разбавлением 10^{-1}.

Пример [30] — Двадцать пробирок с бульоном двойной концентрации были засеяны аликвотами по 5 см^3 десятикратно разбавленной пробы (0,1 г/см^3). После термостатирования 16 пробирок из 20 показали заметный рост. Какова была наиболее вероятная бакте-

риальная плотность (организмов на грамм) в пробе? Таблица В.3 дает значение 1,61 как наиболее вероятное число организмов на пробирку при нижнем пределе 95 %-ного доверительного интервала, равном 0,93, и верхнем пределе, равном 2,77.

В каждую пробирку было добавлено 5 см^3 пробы для анализа, что соответствует 0,5 г пробы. Следовательно, наиболее вероятное число микроорганизмов в 1 г пробы будет задаваться как

$M = \frac{1,61}{0,5}$ на грамм = 3,22 на грамм со следующим 95 %-ным доверительными интервалами:

нижний предел 95 %-ного доверительного интервала, с нижним пределом 2,5 %:

$\frac{0,93}{0,5}$ на грамм = 1,9 на грамм;

верхний предел 95 %-ного доверительного интервала, с верхним пределом 97,5 %:

$\frac{2,77}{0,5}$ на грамм = 5,5 на грамм.

10.5.6.2.2 Таблицы для нескольких разведений: три последовательных разведения

Для симметричных способов общей практикой является использование трех последовательных разведений с тремя (таблица С.5), пятью (таблица С.6) или десятью (таблица С.7) параллельными пробирками в каждом разведении. Записывают число положительных пробирок для каждого набора пробирок, и по таблице НВЧ для использованного способа посева подсчитывают наиболее вероятное число микроорганизмов, присутствующих в контрольном объеме образца.

Эти пересмотренные таблицы также содержат десятичные логарифмы для НВЧ, их стандартные отклонения $S_{(\log_{10} M)}$, нижний и верхний пределы для 95 %-ного доверительного интервала совместно с указанием «значения редкости» и «категории редкости». Значение редкости (основанное на научном труде Blodgett [52] — [54]) предоставляет упрощенный подход к оценке вероятности того, что наблюдаемое значение будет получено в процессе испытания.

Некоторые комбинации положительных пробирок встречаются чаще, чем другие. Например, комбинация положительных пробирок 0, 0, 3 встречается гораздо реже комбинации 3, 2, 1. Индекс редкости был рассчитан в качестве соотношения двух значений вероятности

$$r = \frac{L(\hat{\mu})}{L_0(\hat{\mu})},$$

где $L(\hat{\mu})$ — вероятность наблюдаемого результата, для серии разведений $x_1, x_2 \ldots x_k$;

$L_0(\hat{\mu})$ — вероятность того, что результат скорее всего будет равным концентрации μ оценке $\hat{\mu}$ концентрации μ.

Полная процедура расчета функции вероятности приведена в [56].

Индекс редкости представляет собой значение от 0 до 1. Оно равно единице, если результат серийного исследования с использованием разведений представляет собой концентрацию, равную оцененному НВЧ. Если это значение приближается к 0, то результат серии исследований с использованием разведений с большой вероятностью не соответствует концентрации, равной оцененному НВЧ. Используя подход, изложенный в [27], используют три категории редкости:

Категория 1:

Значения НВЧ чаще всего наблюдаются, если его значения редкости оказываются в диапазоне 0,05 — 1,00, $0,05 \le n \le 1,00$, т. е. такой результат будет вероятно получен в 95 % случаев.

Категория 2:

Значения НВЧ получают редко, только если его значения редкости находятся в диапазоне 0,01 — 0,05, $0,01 \le n \le 0,05$, т. е. такой результат будет получен с частотой менее 5 %.

Категория 3:

Значения НВЧ получают крайне редко, только если его значения редкости находятся в диапазоне 0 — 0,01, $0 \le n \le 0,01$, т. е. такой результат будет получен реже, чем 1 на 100 исследований.

В таблицах приведены только те комбинации результатов, которые относятся только к категориям 1 и 2.

В варианте, где используют более трех разведений, важно использовать все значения измеряемых данных. С научной точки зрения некорректно «отбирать» комбинации значений, предполагая, что эти значения более «корректные», чем другие комбинации. Следует записать

результаты всех возможных комбинаций положительных пробирок и вычислительные таблицы (см. 10.5.6.3), используемые для расчета значений НВЧ.

10.5.6.3 Компьютерные программы

Используемые для определения значений НВЧ программы необходимы для идентификации маловероятных комбинаций пробирок, поскольку такие комбинации могут отражать трудности выполнения микробиологических анализов (см. 10.5.6.2.2 с учетом маловероятных комбинаций пробирок и использования таблиц расчета НВЧ). Некоторые компьютерные программы пригодны для расчета значений НВЧ с использованием электронных таблиц программы Excel® (см. примечание), однако многие программы не пригодны для оценки в тех случаях, когда в программу были введены маловероятные комбинации пробирок и когда для оценивания доверительных пределов были использованы различные подходы.

Было разработано новое программное обеспечение для использования в Excel® (см. примечание), в котором можно обрабатывать до 10 уровней серийных разведений. Программа использовалась для расчета оценок НВЧ, их параметры представлены в пересмотренных таблицах С.5, С.6 и С.7. Настоятельно рекомендуется использовать эти программы применительно к другим, с учетом того, что получены идентичные результаты для любых конкретных комбинаций результатов, рассчитанных для трех разведений, по сравнению с опубликованными таблицами. Подробное описание расчетов приведено в [55], а программу можно бесплатно скачать по ссылке:

http://standards.iso.org/iso/7218.

Если электронные таблицы Excel® демонстрируют, что какая-либо комбинация пробирок является маловероятной, то соответствующие значения НВЧ не следует принимать во внимание.

Примечание — Excel® является торговым наименованием продукции, поставляемой Microsoft. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего документа и не накладывает обязательств со стороны ISO в отношении указанной продукции. Можно использовать эквивалентную продукцию, если она дает аналогичные результаты.

11 Метод выявления (качественный метод)

11.1 Общие положения

Метод выявления является методом, который определяет присутствие или отсутствие конкретных микроорганизмов в данном количестве продукта.

11.2 Принцип

Если в соответствующем стандарте нет особых примечаний, перемешивают (жидкие продукты) или гомогенизируют (прочие продукты) количество P продукта, подлежащего анализу, с $9 \cdot P$ см^3 или $9 \cdot P$ г элективного и/или селективного питательного бульона.

Чтобы облегчить оживление подвергнувшихся стрессовым воздействиям микроорганизмов в пищевых продуктах, пробы обычно предварительно обогащают в неселективном питательном бульоне с последующим элективным обогащением и изолированием на селективной/дифференциальной агаровой среде. Применение двух различных бульонов для обогащения, а также двух или нескольких селективных агаровых сред увеличивает чувствительность метода.

После инкубации микроорганизмов в термостате по поверхности селективной агаровой среды бактериологической петлей распределяют выросшую культуру таким образом, чтобы получить изолированные колонии. Если нет иных указаний, после термостатирования обогащенные питательные бульоны можно поместить в холодильник, только при условии выполнения оценки влияния охлаждения на результаты и четкого упоминания об этом в протоколе испытания.

После термостатирования несколько колоний (обычно пять на чашку с агаровой средой) подвергают идентификации, используя подходящую методику для подтверждения.

Выбор колоний для подтверждения должен охватывать репрезентативные типы сомнительных колоний.

11.3 Измерение неопределенности

Оценка неопределенности измерения качественных определений разрабатывается ISO/TC 34/SC 9.

12 Метод идентификации (подтверждения)

12.1 Общие положения

Для биохимического и серологического подтверждения используют только чистые культуры.

Стандартные методы подтверждения описаны в соответствующих нормативных документах. В качестве альтернативы биохимическим методам, приведенным в этих стандартах, методы подтверждения, указанные в данном разделе (биохимические наборы, нуклеиновые пробы), следует использовать в условиях, указанных также в данном разделе, если они особо не оговорены в соответствующих стандартах.

12.2 Приготовление чистой культуры

Приготовление чистых культур начинают с выделения одной колонии в агаровой среде. Затем выделенную колонию пересевают на неселективную агаровую среду. После инкубации в термостате выделяют хорошо изолированную колонию для последующих подтверждающих испытаний. При необходимости посев колонии повторяют.

Желательно выполнять идентификацию, используя клетки одной колонии. Если в одной колонии недостаточного количества клеточного материала, материал вначале рекомендуется посеять в жидкую среду или на косой агар (косяк), после чего можно использовать субкультуру для выполнения испытаний.

12.3 Окрашивание по Граму (модифицированный метод Хакера)

12.3.1 Общие положения

Данный способ окрашивания бактериальных клеток позволяет описать морфологию бактерий и разделить их на две группы по тому, способны они или нет сохранять цвет кристаллического фиолетового (грамположительные Грам+) в условиях исследования. Результаты такого деления, главным образом, вытекают из различий в структуре клеточных стенок двух групп, что коррелирует с другими основными различиями между двумя группами.

Удовлетворительной альтернативой окрашивания по Граму является использование 3 %-ного раствора гидроокиси калия (KOH). Полную петлю выросшей культуры бактерий перемешивают в двух каплях раствора KOH. Грамотрицательные (Грам-) бактерии станут причиной увеличения вязкости и слизистости раствора в течение 30 с, так что смесь тянется за бактериологической петлей при поднятии петли.

Существует несколько приемов выполнения окрашивания по Граму, но все они соответствуют последовательности, приведенной 12.3.2.

12.3.2 Растворы

12.3.2.1 Общие положения

Допускается использовать имеющиеся в продаже готовые растворы.

В таком случае следуют рекомендациям изготовителя.

12.3.2.2 Раствор кристаллического фиолетового

12.3.2.2.1 Состав:

кристаллический фиолетовый — 2,0 г;

этиловый спирт (95 %) — 20 см^3;

оксалат аммония ($C_2H_8N_2O_4$) — 0,8 г;

вода — 80 см^3.

12.3.2.2.2 Приготовление

Растворяют кристаллический фиолетовый в этиловом спирте, а оксалат аммония в дистиллированной воде. Смешивают эти два раствора и оставляют смесь на 24 ч до использования.

12.3.2.3 Раствор йода

12.3.2.3.1 Состав:

йод — 1,0 г;

йодистый калий (KI) — 2,0 г;

вода —100 см^3.

12.3.2.3.2 Приготовление

Йодистый калий растворяют в 10 см^3 воды и добавляют крапинки йода. После растворения доводят до 100 см^3 в мерной колбе.

12.3.2.4 Раствор сафранина

12.3.2.4.1 Состав:

сафранин — 0,25 г;

этиловый спирт (95 %) — 10 $см^3$;

вода — 100 $см^3$.

12.3.2.4.2 Приготовление

Растворяют сафранин в этиловом спирте, затем смешивают с дистиллированной водой.

12.3.3 Техника окрашивания

После фиксации на предметном стекле бактериального мазка, приготовленного из 18 — 24 -часовой культуры или мутного бульона, заливают мазок раствором кристаллического фиолетового. Оставляют на 1 мин для осуществления реакции.

Стекло под наклоном осторожно промывают в течение нескольких секунд водой.

Наносят на стекло раствор йода. Оставляют на 1 мин для осуществления реакции.

Стекло под наклоном осторожно промывают водой в течение нескольких секунд.

Стекло в наклонном положении осторожно и непрерывно промывают этанолом (95 %) в течение не более 30 с до прекращения вымывания фиолетового красителя.

Стекло в наклонном положении осторожно промывают водой для удаления этилового спирта. Наносят на стекло раствор сафранина и оставляют на 10 с. Стекло под наклоном осторожно промывают водой.

Высушивают стекло.

12.3.4 Оценка результатов

Окрашенный мазок просматривают под микроскопом, используя для этого светосильный объектив с масляной иммерсией. Бактериальные клетки, окрашенные в синий или фиолетовый цвет, относят к грамположительным (Грам +); другие, окрашенные в цвета от темно-розового до красного, относят к грамотрицательным (Грам −).

У чистых культур некоторых типов бактерий в поле микроскопа могут присутствовать как грамположительные, так и грамотрицательные клетки.

Примечание — Плотные скопления клеток могут давать нетипичную картину окрашивания.

12.4 Использование биохимических наборов для идентификации

Можно использовать имеющиеся биохимические наборы для идентификации изолированных колоний.

Проверяют пригодность биохимических наборов, как показано в ходе оценочных исследований, опубликованных в международной научной литературе, касающейся предпочтительно микробиологии пищевых продуктов[1)]. Такая проверка особенно важна, если изготовитель не имеет данных об адекватности своих наборов.

Лаборатория должна получить сертификат контроля на каждую партию с указанием испытанных штаммов.

Изготовитель должен также определить контрольные штаммы, которые лаборатория может использовать для проверки сохранности характеристик биохимических наборов.

Наборы должны включать, как минимум, биохимические тесты, описанные в соответствующих стандартах, или к ним должны прилагаться другие тесты.

12.5 Применение нуклеиновых зондов для идентификации

Имеющиеся в настоящее время нуклеиновые зонды можно использовать для идентификации изолированных колоний.

Необходимо проверить, чтобы нуклеиновые зонды, используемые для идентификации, были пригодны, как показывают оценочные исследования, опубликованные в международной научной литературе, предпочтительно касающейся микробиологии пищевых продуктов (см., например, [23]). Такая проверка особенно важна, если изготовитель не предоставляет данных об адекватности этих зондов.

Лаборатория должна получить сертификат контроля на каждую партию с указанием испытанных штаммов.

[1)] Запросы об информации следует направлять в национальные, региональные или международные справочные центры, указанные для каждого микроорганизма.

Изготовитель должен также определить контрольные штаммы, которые лаборатория может использовать для проверки сохранности характеристик биохимических наборов.

12.6 Серологические методы

12.6.1 Общие положения

Если необходима серологическая идентификация, ее выполняют после биохимической идентификации изолированных колоний.

12.6.2 Реакция агглютинации на предметном стекле

Реакция антиген-антитело вызывает слипание бактериальных клеток и образование рыхлых масс или плотных гранул. В случае бактерий семейства Enterobacteriaceae реакция между «Н» (т. е. флагеллярным) антигеном и гомологичной антисывороткой дает рыхлое слипание, тогда как реакция с участием «О» (т. е. соматического) антигена дает более плотное слипание в гранулы.

Перед реакцией агглютинации с антисыворотками рекомендуется выполнить тест, чтобы определить, агглютинируют ли бактериальные клетки в растворе хлорида натрия [3 % (по массе)]. Если бактериальные клетки агглютинируют, штамм является склонным к аутоагглютинации и его не следует использовать в реакции агглютинации.

Имеющиеся в продаже готовые антисыворотки бывают двух типов:

- поливалентная антисыворотка, которая реагирует с микроорганизмами конкретного вида или с группами сероваров (серотипов бактериальной клетки) и которая пригодна для предварительной идентификации;
- специфичные моноклональные антитела, применение которых позволит идентифицировать конкретный серовар.

Лаборатория должна получить сертификат контроля качества на каждую партию антисыворотки с указанием контрольных штаммов.

Проверяют, чтобы реакция агглютинации на предметном стекле удовлетворяла требованиям данной задачи, как показывают оценочные исследования, опубликованные в международной научной литературе, преимущественно касающейся микробиологии пищевых продуктов[1)].

При использовании реактивов рекомендуется использовать положительный и отрицательный контроль, удовлетворяющий условиям реакции.

12.6.3 Реакция латекс-агглютинации

Более быстрый метод можно выполнить с имеющимися в продаже наборами, с применением частиц латекса, покрытых специфичными для группы бактерий антителами (например, для информации, касающейся Escherichia coli O157, см. [43]; касающейся Staphylococcus aureus, см. [38]). Антиген в экстракте испытывают против ряда латексных реактивов.

Проверяют, чтобы агглютинация на латексе удовлетворяла требованиям данного исследования, что подтверждено в оценочных исследованиях, описанных в международной научной литературе и преимущественно связанных с микробиологией пищевых продуктов.

Лаборатория должна получить сертификат контроля качества на каждую партию с указанием штаммов.

При использовании реактивов следует использовать положительный и отрицательный контроли, удовлетворяющие условиям реакции.

13 Протокол испытаний

В протоколе испытаний должен быть указан использованный метод, температура инкубации в термостате, если необходимо, и полученные результаты. Также необходимо упомянуть все детали испытания, не установленные в настоящем стандарте, а также считающиеся необязательными, наряду с подробностями всех происшествий, которые могли повлиять на результаты.

В протоколе испытаний также необходимо указать, нужно ли проводить дальнейшие испытания в другой лаборатории для сравнения, и, если такие испытания были выполнены, каковы их результаты.

В протокол испытаний необходимо включать всю информацию, необходимую для полной идентификации образца. Допускается включать информацию, необходимую для трактовки результатов испытания.

Если необходимо, в протокол испытаний следует включать измерение неопределенности в соответствии с ISO 19036.

[1)] Запросы об информации следует направлять в национальные, региональные или международные справочные центры, указанные для каждого микроорганизма.

14 Валидация (обоснованность) микробиологических методов

14.1 Валидация (обоснованность) стандартных методов

Валидация стандартных методов рассматривается ISO/TC 34/SC 9.

14.2 Валидация (обоснованность) альтернативных методов

В стандарте ISO 16140-2 описан технический протокол и валидация альтернативных методов по стандартным методам.

14.3 Валидация (обоснованность) собственных методов

Валидация собственных методов исследуется ISO/TC 34/SC 9.

15 Обеспечение качества результатов/контроля качества исполнения

15.1 Внутренний контроль качества

15.1.1 Внутренний контроль качества включает все процедуры, проводимые лабораторией для постоянной оценки своей работы. Главная цель заключается в обеспечении логичности результатов на повседневной основе и их соответствие четко определенным критериям.

15.1.2 Для того чтобы продемонстрировать, что изменчивость (среди аналитиков, оборудования и материалов) находится под контролем, необходимо разработать программу периодических проверок. Необходимо включить все испытания, входящие в регламент деятельности лаборатории.

Эта программа может включать:

- использование искусственно зараженных образцов, с различным уровнем заражения, включая специфическую и фоновую флору;
- использование искусственно зараженных/естественным образом зараженных образцов на различных матрицах;
- использование стандартных образцов (включая испытание материалов по схеме проверки квалификации);
- параллельное испытание;
- параллельная оценка результатов испытания.

Интервал между этими проверками будет зависеть от характера испытаний, выполняемых лабораторией, и частоты, с которой выполняются испытания.

Рекомендуется, там, где возможно, чтобы испытания включали проверку исполнения.

15.1.3 В особых случаях лаборатория может выполнить определенное испытание, которое выполняет очень редко. Необходимо признать, что в таких случаях принятый интервал программы внутреннего контроля качества может не подойти, а схема демонстрации удовлетворительного исполнения, которая выполняется параллельно с испытанием, может оказаться более подходящей.

15.2 Эталонные штаммы

Сохранение эталонных штаммов — по ISO 11133.

15.3 Внешний контроль качества (оценка качества сторонней организацией)

Лаборатории должны регулярно участвовать в схемах проверки квалификации, которые соответствуют объему их деятельности. Предпочтение должно быть отдано схемам, которые используют подходящие матрицы.

Лабораториям рекомендуется использовать оценку качества сторонней организацией не только для оценки систематической погрешности лаборатории, но и для проверки надежности всей их системы качества

Приложение А
(справочное)

Свойства некоторых дезинфицирующих веществ

Т а б л и ц а А.1 – Свойства некоторых дезинфицирующих веществ

Дезинфицирующие вещества	Активно против						
	Грибы	Бактерии		Микро-бактерии	Споры	Липоидные вирусы	Нелипоидные вирусы
		Грам +	Грам –				
Гипохлориты	+	+++	+++	++	++	+	+
Спирты	–	+++	+++	+++	–	+	V
Формальдегид	+++	+++	+++	+++	+++ [a]	+	+
Глутаральдегид	+++	+++	+++	+++	+++ [b]	+	+
Иодофоры	+++	+++	+++	+++	+	+	+

+++ — хорошая;
++ — умеренная;
+ — незначительная;
– — нулевая;
V — зависит от вируса;
C — катионная;
A — анионная;
NA — не применяется.
[a] свыше 40 °C.
[b] свыше 20 °C.
Источник: [17].

Окончание таблицы А.1

Дезинфицирующие вещества	Неактивно против					Токсичность		
	Белок	Природные материалы	Синтетические материалы	Жесткая вода	Детергент	Кожа	Глаза	Легкие
Гипохлориты	+++	+	+	+	C	+	+	+
Спирты	+	+	+	+	–		+	
Формальдегид	+	+	+	+	–	+	+	+
Глутаральдегид	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++
Иодофоры	+++	+	+	+	A	+	+	–

+++ — хорошая;
++ — умеренная;
+ — незначительная;
– — нулевая;
V — зависит от вируса;
C — катионная;
A — анионная;
NA — не применяется.
[a] свыше 40 °C.
[b] свыше 20 °C.
Источник: [17].

Приложение В
(справочное)

Доверительные интервалы для методики подсчета колоний

В.1 Доверительные интервалы для методики подсчета колоний

Для оценки достоверности результатов и во избежание чрезмерно строгих интерпретаций, необходимо оценить погрешность измерения или, при невозможности, оценить доверительный интервал, который характеризует микробиологическое статистическое распределение в пробе.

При отсутствии значения недостоверности измерений, доверительный интервал δ, который характеризует микробиологическую дисперсию, может быть рассчитан по формуле В.1 (с вероятностью 95 %):

$$\delta = \left[\frac{\sum C}{B} \pm \frac{1{,}96\sqrt{\sum C}}{B} \right] \cdot \frac{1}{d}, \qquad (B.1)$$

где $B = V(n_1 + 0{,}1n_2)$

где V — объем инокулята в каждой чашке, см^3;

n_1 — число чашек, отобранных для первого разведения;

n_2 — число чашек, отобранных для второго разведения;

ΣC — сумма колоний, подсчитанных на чашках, отобранных для двух последовательных разведений;

d — коэффициент разбавления для первого разведения.

ПРИМЕР 1

Подсчет дал следующие результаты (метод с использованием одной чашки на разбавление):
- при первом отобранном разведении (10^{-2}): 215 колоний;
- при втором отобранном разведении (10^{-3}): 14 колоний.

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot [n_1 + (0{,}1 \cdot n_2)] \cdot d} = \frac{215 + 14}{1 \cdot [1 + (0{,}1 \cdot 1)] \cdot 10^{-2}} = \frac{229}{0{,}011} = 20818$$

Результат округляют, как это установлено в основном тексте документа, количество микроорганизмов равно 21 000 или $2{,}1 \cdot 10^4$ на кубический сантиметр или грамм продукта.

При $N = 2{,}1 \cdot 10^4$ на грамм, для 229 подсчитанных колоний доверительный интервал δ равен:

$$\delta = \left[\frac{229}{1{,}1} \pm \frac{1{,}96\sqrt{229}}{1{,}1} \right] \cdot \frac{1}{10^{-2}},$$

$$\delta = (208{,}18 \pm 26{,}96) \cdot 10^2.$$

Таким образом, пределы доверительного интервала равны:
$\delta_1 = 1{,}8 \cdot 10^4$ и $\delta_2 = 2{,}4 \cdot 10^4$

ПРИМЕР 2

Подсчет дал следующие результаты (метод с использованием двух чашек на разбавление):
- при первом отобранном разведении (10^{-2}): 168 и 215 колоний;
- при втором отобранном разведении (10^{-3}): 14 и 25 колоний.

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot [n_1 + (0{,}1 \cdot n_2)] \cdot d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \cdot [2 + (0{,}1 \cdot 2)] \cdot 10^{-2}} = \frac{422}{0{,}022} = 19182$$

Результат округляют, как это установлено в основном тексте документа, количество микроорганизмов равно 19 000 или $1{,}9 \cdot 10^4$ на кубический сантиметр или грамм продукта.

При $N = 1{,}9 \cdot 10^4$ на грамм, для 422 подсчитанных колоний доверительный интервал δ равен:

$$\delta = \left[\frac{422}{2{,}2} \pm \frac{1{,}96\sqrt{422}}{2{,}2} \right] \cdot \frac{1}{10^{-2}},$$
$$\delta = (191{,}82 \pm 18{,}30) \cdot 10^2.$$

Таким образом, пределы доверительного интервала равны:
$\delta_1 = 1{,}7 \cdot 10^4$ и $\delta_2 = 2{,}4 \cdot 10^4$

Таблица В.1 содержит средневзвешенные значения и доверительные интервалы δ для соответствующего количества колоний.

Таблица В.1 — Средневзвешенные значения и доверительные интервалы δ для соответствующего количества колоний

Средневзвешенные значения числа колоний, подсчитанных для двух последовательных разведений	Способ «1 чашка на разведение» Доверительный интервал δ	Способ «2 чашки на разведение» Доверительный интервал δ
300	268–332	277–323
150	127–173	134–166
100	81–119	87–113
30	20–40	23–37
15	7–22	10–20
10	4–16	6–14
7	Неприменимо	3–10

В.2 Особые случаи для малых количеств

Доверительные интервалы приведены в таблицах В.2–В.5.

Таблица В.2 — Доверительные интервалы для подсчета по методу «одна чашка на разведение», случай малых количеств, подсчитанных на отдельной чашке

Число колоний[a]	Доверительные пределы при аппроксимированном доверительном уровне 95 %[b]		Доверительный предел, в процентах
	Нижний	Верхний	
1	<1	3	±196
2	<1	5	±139
3	<1	6	±113
4	<1	8	±98
5	<1	9	±88
6	1	11	±80
7	2	12	±74
8	2	14	±69
9	3	15	±65
10	4	16	±62
11	4	18	±59
12	5	19	±57
13	6	20	±54
14	7	21	±52
15	7	23	±51

[a] Количество колоний, подсчитанных на одной чашке при одном разведении.

[b] По сравнению с числом подсчитанных микроорганизмов и исходя из предположения, что подсчет произведен на одной чашке при одном разведении.

Таблица В.3 — Доверительные пределы для подсчета по методу «одна чашка на разведение», случай малых количеств, подсчитанных на двух отдельных чашках при двух разведениях

Число колоний[a]	Число микроорганизмов[b]	Доверительные пределы при аппроксимированном доверительном уровне 95 %[c]		Доверительный предел, в процентах
		Нижний	Верхний	
1	NA[d]	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA
10	9	3	15	±62
11	10	4	16	±59
12	11	5	17	±57
13	12	5	18	±54

Окончание таблицы В.3

Число колоний[a]	Число микроорганизмов[b]	Доверительные пределы при аппроксимированном доверительном уровне 95 %[c]		Доверительный предел, в процентах
		Нижний	Верхний	
14	13	6	19	±52
15	14	7	21	±51

[a] Число колоний, подсчитанных га одной чашке Петри при двух последовательных разведениях.

[b] Средневзвешенное значение для двух чашек Петри.

[c] По сравнению с числом подсчитанных микроорганизмов и исходя из предположения, что подсчет произведен на одной чашке при двух разведениях.

[d] Неприменимо (Not available, NA): средневзвешенное значение нельзя рассчитать.

Таблица В.4 — Доверительные пределы для подсчета по методу «две чашки на разведение», случай малых количеств, подсчитанных на двух чашках при одном разведении

Число колоний[a]	Число микроорганизмов[b]	Доверительные пределы при аппроксимированном доверительном уровне 95 %[c]		Доверительные пределы, в процентах
		Нижний	Верхний	
1	1	<1	1	±196
2	1	<1	2	±139
3	2	<1	3	±113
4	2	<1	4	±98
5	3	<1	5	±88
6	3	<1	5	±80
7	4	<1	6	±74
8	4	1	7	±69
9	5	2	7	±65
10	5	2	8	±62
11	6	2	9	±59
12	6	3	9	±57
13	7	3	10	±54
14	7	3	11	±52
15	8	4	11	±51
16	8	4	12	±49
17	9	4	13	±48
18	9	5	13	±46
19	10	5	14	±45
20	10	6	14	±44
21	11	6	15	±43
22	11	6	16	±42
23	12	7	16	±41
24	12	7	17	±40
25	13	8	17	±39
26	13	8	18	±38
27	14	8	19	±38
28	14	9	19	±37
29	15	9	20	±36
30	15	10	20	±36

[a] Число колоний, подсчитанное на двух чашках Петри при одном разведении.

[b] Среднеарифметическое для двух чашек Петри.

[c] По сравнению с числом подсчитанных микроорганизмов и исходя из предположения, что подсчет произведен на двух чашках при одном разведении.

Таблица В.5 — Доверительные интервалы для подсчета по методу «две чашки на разведение», случай малых количеств, подсчитанных на двух чашках при двух разведениях

Число колоний[a]	Число микроорганизмов[b]	Доверительные пределы при аппроксимированном доверительном уровне 95 %[c]		Доверительные пределы, в процентах
		Нижний	Верхний	
1	NA[d]	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA
10	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA
12	5	2	9	±57
13	6	3	9	±54
14	6	3	10	±52
15	7	3	10	±51
16	7	4	11	±49
17	8	4	11	±48
18	8	4	12	±46
19	9	5	13	±45
20	9	5	13	±44
21	10	5	14	±43
22	10	6	14	±42
23	10	6	15	±41
24	11	7	15	±40
25	11	7	16	±39
26	12	7	16	±38
27	12	8	17	±38
28	13	8	17	±37
29	13	8	18	±36
30	14	9	19	±36

[a] Число колоний, подсчитанное на двух чашках Петри при двух последовательных разведениях.

[b] Средневзвешенное значение для четырех чашек Петри.

[c] По сравнению с числом подсчитанных микроорганизмов и исходя из предположения, что подсчет произведен на двух чашках при двух разведениях.

[d] Неприменимо (Not available, NA): средневзвешенное значение нельзя рассчитать.

Приложение С
(обязательное)

Определение наиболее вероятного числа

Таблица С.1 — Значения НВЧ для анализируемой пробы и доверительные пределы 95 % для серии из 10 пробирок, рассчитанные в соответствии с [29]

Число положительных пробирок	Серия из 10 пробирок			
	НВЧ/см^3 или /г	Стандартная неопределенность $\log_{10}M$	Пределы (95 %)	
			Нижний	Верхний
1	0,11	0,435	0,02	0,75
2	0,22	0,308	0,06	0,89
3	0,36	0,252	0,11	1,11
4	0,51	0,220	0,19	1,38
5	0,69	0,198	0,28	1,69
6	0,92	0,184	0,40	2,10
7	1,20	0,174	0,55	2,64
8	1,61	0,171	0,75	3,48
9	2,30	0,179	1,03	5,16

Таблица С.2 — Значения НВЧ для анализируемой пробы и доверительные пределы 95 % для серии из 15 пробирок, рассчитанные в соответствии с [29]

Число положительных пробирок	Серия из 15 пробирок			
	НВЧ/см^3 или /г	Стандартная неопределенность $\log_{10}M$	Пределы (95 %)	
			Нижний	Верхний
1	0,07	0,434	0,01	0,49
2	0,14	0,307	0,04	0,57
3	0,22	0,251	0,07	0,69
4	0,31	0,218	0,12	0,83
5	0,41	0,196	0,17	0,98
6	0,51	0,179	0,23	1,15
7	0,63	0,167	0,30	1,33
8	0,76	0,157	0,37	1,55
9	0,92	0,150	0,47	1,80
10	1,10	0,144	0,57	2,11
11	1,32	0,141	0,70	2,49
12	1,61	0,139	0,86	3,02
13	2,01	0,142	1,06	3,82
14	2,71	0,155	1,35	5,45

Таблица С.3 — Значения НВЧ для анализируемой пробы и доверительные пределы 95 % для серии из 20 пробирок, рассчитанные в соответствии с [29]

Число положительных пробирок	Серия из 20 пробирок			
	НВЧ/см^3 или /г	Стандартная неопределенность $\log_{10}M$	Пределы (95 %)	
			Нижний	Верхний
1	0,05	0,434	0,01	0,36
2	0,11	0,307	0,03	0,42
3	0,16	0,251	0,05	0,50
4	0,22	0,218	0,08	0,60
5	0,29	0,195	0,12	0,69
6	0,36	0,178	0,16	0,80
7	0,43	0,165	0,20	0,91
8	0,51	0,155	0,25	1,03
9	0,59	0,147	0,31	1,16
10	0,69	0,140	0,37	1,30
11	0,80	0,134	0,44	1,46
12	0,92	0,130	0,51	1,65
13	1,05	0,126	0,59	1,85
14	1,20	0,123	0,69	2,10
15	1,39	0,121	0,80	2,40

Окончание таблицы С.3

Число положительных пробирок	Серия из 20 пробирок			
	НВЧ/см³ или /г	Стандартная неопределенность $\log_{10}M$	Пределы (95 %)	
			Нижний	Верхний
16	1,61	0,121	0,93	2,77
17	1,90	0,122	1,09	3,29
18	2,30	0,127	1,30	4,08
19	3,00	0,141	1,58	5,67

Таблица С.4 — Значения НВЧ для анализируемой пробы и доверительные пределы 95 % для серии из 25 пробирок, рассчитанные в соответствии с [29]

Число положительных пробирок	Серия из 25 пробирок			
	НВЧ/см³ или /г	Стандартная неопределенность $\log_{10}M$	Пределы (95 %)	
			Нижний	Верхний
1	0,04	0,434	0,01	0,29
2	0,08	0,307	0,02	0,33
3	0,13	0,251	0,04	0,40
4	0,17	0,217	0,07	0,47
5	0,22	0,195	0,09	0,54
6	0,27	0,178	0,12	0,61
7	0,33	0,165	0,16	0,69
8	0,39	0,154	0,19	0,77
9	0,45	0,146	0,23	0,86
10	0,51	0,139	0,27	0,96
11	0,58	0,133	0,32	1,06
12	0,65	0,128	0,37	1,16
13	0,73	0,123	0,42	1,28
14	0,82	0,119	0,48	1,41
15	0,92	0,116	0,54	1,55
16	1,02	0,113	0,61	1,70
17	1,14	0,111	0,69	1,88
18	1,27	0,109	0,78	2,09
19	1,43	0,108	0,88	2,33
20	1,61	0,108	0,99	2,62
21	1,83	0,109	1,12	2,99
22	2,12	0,111	1,29	3,50
23	2,53	0,117	1,49	4,28
24	3,22	0,123	1,77	5,85

Таблица С.5 — Значения НВЧ на грамм пробы и 95 % доверительные пределы (при использовании трех проб массой 1 г, трех проб массой 0,1 г и трех проб массой 0,01 г) [56]

Количество положительных результатов для инокулированного объема, см³ или г			НВЧ/см³ или /г	$\log_{10}M$	Стандартное отклонение $\log_{10}M$	95 % доверительные пределы		Индекс редкости	Категория редкости
1,00	0,10	0,01				Нижний	Верхний		
0	0	0	0	NA[a]	NA[a]	0	1,1	1,00	1
0	1	0	0,31	–0,51	0,43	0,04	2,3	0,09	1
1	0	0	0,36	–0,44	0,44	0,05	2,7	1,00	1
1	0	1	0,72	–0,14	0,31	0,17	3,0	0,02	2
1	1	0	0,74	–0,13	0,31	0,18	3,1	0,21	1
1	2	0	1,1	0,04	0,26	0,35	3,7	0,02	2
2	0	0	0,92	–0,04	0,32	0,21	4,0	1,00	1
2	0	1	1,4	0,15	0,27	0,42	4,9	0,04	2
2	1	0	1,5	0,18	0,27	0,43	5,0	0,43	1
2	1	1	2,0	0,30	0,24	0,70	6,0	0,02	2
2	2	0	2,1	0,32	0,24	0,71	6,2	0,07	1
3	0	0	2,3	0,36	0,31	0,55	9,7	1,00	1
3	0	1	3,9	0,59	0,31	0,93	16	0,08	1
3	1	0	4,3	0,63	0,33	0,95	19	1,00	1
3	1	1	7,5	0,88	0,30	1,9	30	0,21	1

Окончание таблицы С.5

Количество положительных результатов для инокулированного объема, $см^3$ или г			НВЧ/$см^3$ или /г	$\log_{10}M$	Стандартное отклонение $\log_{10}M$	95 % доверительные пределы		Индекс редкости	Категория редкости
1,00	0,10	0,01				Нижний	Верхний		
3	1	2	12	1,1	0,26	3,6	37	0,02	2
3	2	0	9,3	0,97	0,32	2,2	40	1,00	1
3	2	1	15	1,2	0,27	4,4	51	0,42	1
3	2	2	22	1,3	0,24	7,2	64	0,07	1
3	3	0	24	1,4	0,32	5,6	100	1,00	1
3	3	1	46	1,7	0,34	9,6	220	1,00	1
3	3	2	110	2,0	0,32	25	490	1,00	1
3	3	3	∞	NA[a]	NA[a]	36	∞	1,00	1
[a] Неприменимо (Not available, NA).									

Таблица С.6 — Значения НВЧ на грамм пробы и 95 % доверительные пределы (при использовании пяти проб массой 1 г, пяти проб массой 0,1 г и пяти проб массой 0,01 г). [56]

Количество положительных результатов для инокулированного объема, $см^3$ или г			НВЧ/$см^3$ или /г	$\log_{10}M$	Стандартное отклонение $\log_{10}M$	95 % доверительные пределы		Индекс редкости	Категория
1	0,1	0,01				Нижний	Верхний		
0	0	0	0	NA	NA	0	0,66	1	1
0	1	0	0,18	–0,74	0,43	0,02	1,34	0,09	1
1	0	0	0,20	–0,70	0,44	0,03	1,47	1,00	1
1	0	1	0,40	–0,40	0,31	0,10	1,65	0,02	2
1	1	0	0,40	–0,39	0,31	0,10	1,66	0,21	1
1	2	0	0,61	–0,21	0,25	0,19	1,96	0,02	2
2	0	0	0,45	–0,35	0,31	0,11	1,86	1,00	1
2	0	1	0,68	–0,17	0,25	0,21	2,18	0,03	2
2	1	0	0,68	–0,16	0,25	0,21	2,2	0,35	1
2	1	1	0,92	–0,04	0,22	0,33	2,55	0,02	2
2	2	0	0,93	–0,03	0,22	0,34	2,58	0,06	1
3	0	0	0,78	–0,11	0,26	0,24	2,54	1,00	1
3	0	1	1,1	0,03	0,23	0,38	2,97	0,05	1
3	1	0	1,1	0,03	0,23	0,38	3,02	0,57	1
3	1	1	1,4	0,14	0,20	0,54	3,48	0,03	2
3	2	0	1,4	0,14	0,20	0,54	3,53	0,15	1
3	2	1	1,7	0,23	0,19	0,72	4,02	0,13	2
3	3	0	1,7	0,24	0,19	0,73	4,09	0,03	2
4	0	0	1,3	0,11	0,23	0,44	3,72	1,00	1
4	0	1	1,7	0,22	0,21	0,63	4,4	0,08	1
4	1	0	1,7	0,23	0,21	0,63	4,5	0,92	1
4	1	1	2,1	0,33	0,20	0,85	5,28	0,07	1
4	2	0	2,2	0,33	0,20	0,86	5,41	0,31	1
4	2	1	2,6	0,42	0,19	1,1	6,31	0,03	2
4	3	0	2,7	0,43	0,19	1,1	6,5	0,07	1
4	4	0	3,4	0,53	0,18	1,5	7,8	0,01	2
5	0	0	2,3	0,36	0,24	0,76	7,0	0,77	1
5	0	1	3,1	0,50	0,24	1,1	9,4	0,09	1
5	1	0	3,3	0,52	0,24	1,1	10	1,00	1
5	1	1	4,6	0,66	0,25	1,5	14	0,20	1
5	1	2	6,3	0,80	0,24	2,1	19	0,02	2
5	2	0	4,9	0,69	0,26	1,5	16	1,00	1
5	2	1	7,0	0,85	0,25	2,3	22	0,36	1
5	2	2	9,4	0,97	0,22	3,4	26	0,06	1
5	3	0	7,9	0,90	0,25	2,5	25	1,00	1

Окончание таблицы С.6

Количество положительных результатов для инокулированного объема, см³ или г			НВЧ/см³ или /г	$\log_{10}M$	Стандартное отклонение $\log_{10}M$	95 % доверительные пределы		Индекс редкости	Категория
1	0,1	0,01				Нижний	Верхний		
5	3	1	11	1,0	0,23	3,9	31	0,57	1
5	3	2	14	1,1	0,20	5,5	36	0,15	1
5	3	3	18	1,2	0,19	7,4	42	0,03	2
5	4	0	13	1,1	0,23	4,5	38	1,00	1
5	4	1	17	1,2	0,21	6,5	46	0,94	1
5	4	2	22	1,3	0,20	8,8	56	0,30	1
5	4	3	28	1,4	0,19	11,5	67	0,07	1
5	4	4	35	1,5	0,18	14,8	81	0,01	2
5	5	0	24	1,4	0,24	7,79	74	0,74	1
5	5	1	35	1,5	0,25	10,9	111	1,00	1
5	5	2	54	1,7	0,27	15,7	187	1,00	1
5	5	3	92	2,0	0,26	28	301	1,00	1
5	5	4	160	2,2	0,24	53	489	1,00	1
5	5	5	∞	NA	NA	65	∞	1,00	1

Т а б л и ц а С.7 — Значения НВЧ на грамм пробы и 95 % доверительные пределы (при использовании 10 проб массой 1 г, 10 проб массой 0,1 г и 10 проб массой 0,01 г). [56]

Количество положительных результатов для инокулированного объема, см³ или г			НВЧ/см³ или /г	$\log_{10}M$	Стандартное отклонение $\log_{10}M$	95 % доверительные пределы		Индекс редкости	Категория
1	0,1	0,01				Нижний	Верхний		
0	0	0	0	NA	NA	0	0,33	1,00	1
0	1	0	0,09	-1	0,43	0,012	0,67	0,09	1
1	0	0	0,09	1	0,43	0,013	0,7	0,99	1
1	0	1	0,19	-0,72	0,31	0,046	0,78	0,02	2
1	1	0	0,19	-0,72	0,31	0,046	0,78	0,19	1
1	2	0	0,29	-0,54	0,25	0,09	0,91	0,03	2
2	0	0	0,2	0,7	0,31	0,048	0,82	0,99	1
2	0	1	0,3	-0,52	0,25	0,094	0,95	0,03	2
2	1	0	0,3	-0,52	0,25	0,094	0,95	0,30	1
2	1	1	0,4	-0,4	0,22	0,15	1,1	0,01	2
2	2	0	0,4	0,4	0,22	0,15	1,1	0,06	1
3	0	0	0,32	-0,5	0,25	0,099	1	0,99	1
3	0	1	0,42	0,38	0,22	0,15	1,2	0,04	2
3	1	0	0,42	-0,37	0,22	0,15	1,2	0,43	1
3	1	1	0,53	-0,27	0,2	0,22	1,3	0,02	2
3	2	0	0,53	0,27	0,2	0,22	1,3	0,11	1
3	3	0	0,65	0,19	0,18	0,28	1,5	0,02	2
4	0	0	0,45	0,35	0,22	0,16	1,2	0,99	1
4	0	1	0,56	0,25	0,2	0,23	1,4	0,06	1
4	1	0	0,56	0,25	0,2	0,23	1,4	0,58	1
4	1	1	0,68	-0,17	0,18	0,3	1,6	0,04	2
4	2	0	0,68	-0,16	0,18	0,3	1,6	0,19	1
4	2	1	0,8	0,096	0,17	0,37	1,7	0,02	2
4	3	0	0,81	-0,094	0,17	0,37	1,7	0,05	2
5	0	0	0,6	-0,22	0,2	0,24	1,5	0,98	1
5	0	1	0,72	-0,14	0,18	0,31	1,7	0,07	1
5	1	0	0,73	-0,14	0,18	0,32	1,7	0,75	1
5	1	1	0,85	-0,068	0,17	0,39	1,8	0,07	1
5	2	0	0,86	0,066	0,17	0,4	1,9	0,32	1
5	2	1	0,99	-0,0047	0,16	0,48	2	0,03	2
5	3	0	1	0,0021	0,16	0,48	2,1	0,09	1

Продолжение таблицы С.7

Количество положительных результатов для инокулированного объема, $см^3$ или г			НВЧ/$см^3$ или /г	$log_{10}M$	Стандартное отклонение $log_{10}M$	95 % доверительные пределы		Индекс редкости	Категория
1	0,1	0,01				Нижний	Верхний		
5	4	0	1,1	0,055	0,15	0,57	2,3	0,02	2
6	0	0	0,78	0,11	0,18	0,34	1,8	0,98	1
6	0	1	0,92	0,038	0,17	0,42	2	0,09	1
6	1	0	0,92	0,035	0,17	0,42	2	0,97	1
6	1	1	1,1	0,027	0,16	0,51	2,2	0,10	1
6	2	0	1,1	0,03	0,16	0,51	2,2	0,46	1
6	2	1	1,2	0,085	0,15	0,61	2,4	0,05	1
6	3	0	1,2	0,088	0,15	0,61	2,5	0,15	1
6	3	1	1,4	0,14	0,14	0,71	2,7	0,02	2
6	4	0	1,4	0,14	0,14	0,71	2,7	0,04	2
7	0	0	1	0,0018	0,17	0,45	2,2	0,93	1
7	0	1	1,1	0,062	0,16	0,55	2,4	0,09	1
7	1	0	1,2	0,065	0,16	0,55	2,4	1,00	1
7	1	1	1,3	0,12	0,15	0,65	2,7	0,13	1
7	2	0	1,3	0,13	0,15	0,66	2,7	0,61	1
7	2	1	1,5	0,18	0,15	0,77	3	0,08	1
7	3	0	1,5	0,18	0,15	0,77	3	0,24	1
7	3	1	1,7	0,23	0,14	0,89	3,2	0,04	2
7	4	0	1,7	0,23	0,14	0,89	3,3	0,08	1
7	4	1	1,9	0,28	0,14	1	3,5	0,01	2
7	5	0	1,9	0,28	0,14	1	3,6	0,02	2
8	0	0	1,3	0,11	0,16	0,6	2,7	0,71	1
8	0	1	1,5	0,17	0,16	0,71	3	0,09	1
8	1	0	1,5	0,17	0,16	0,72	3	1,00	1
8	1	1	1,7	0,22	0,15	0,84	3,3	0,17	1
8	1	2	1,9	0,27	0,14	0,97	3,7	0,01	2
8	2	0	1,7	0,23	0,15	0,84	3,4	0,83	1
8	2	1	1,9	0,28	0,15	0,97	3,7	0,14	1
8	2	2	2,1	0,33	0,14	1,1	4	0,01	2
8	3	0	1,9	0,28	0,15	0,98	3,7	0,42	1
8	3	1	2,1	0,33	0,14	1,1	4,1	0,08	1
8	4	0	2,2	0,33	0,14	1,1	4,1	0,16	1
8	4	1	2,4	0,38	0,14	1,3	4,5	0,04	2
8	5	0	2,4	0,38	0,14	1,3	4,6	0,05	2
8	5	1	2,7	0,43	0,13	1,4	5	0,01	2
8	6	0	2,7	0,43	0,13	1,5	5	0,01	2
9	0	0	1,7	0,22	0,16	0,79	3,5	0,53	1
9	0	1	1,9	0,28	0,16	0,93	3,9	0,09	1
9	1	0	1,9	0,29	0,16	0,94	4	1,00	1
9	1	1	2,2	0,34	0,15	1,1	4,4	0,20	1
9	1	2	2,5	0,39	0,15	1,2	4,9	0,02	2
9	2	0	2,2	0,35	0,15	1,1	4,5	1,00	1
9	2	1	2,5	0,4	0,15	1,3	5	0,22	1
9	2	2	2,8	0,45	0,15	1,4	5,5	0,02	2
9	3	0	2,5	0,41	0,15	1,3	5,1	0,66	1
9	3	1	2,9	0,46	0,15	1,5	5,6	0,16	1
9	3	2	3,2	0,51	0,14	1,7	6,3	0,02	2
9	4	0	2,9	0,46	0,15	1,5	5,8	0,31	1
9	4	1	3,3	0,51	0,15	1,7	6,4	0,09	1
9	4	2	3,7	0,56	0,14	1,9	7,1	0,01	2
9	5	0	3,3	0,52	0,15	1,7	6,5	0,12	1
9	5	1	3,7	0,57	0,14	1,9	7,2	0,04	2

Продолжение таблицы С.7

Количество положительных результатов для инокулированного объема, $см^3$ или г			НВЧ/$см^3$ или /г	$\log_{10}M$	Стандартное отклонение $\log_{10}M$	95 % доверительные пределы		Индекс редкости	Категория
1	0,1	0,01				Нижний	Верхний		
9	6	0	3,8	0,58	0,15	2	7,4	0,04	2
9	6	1	4,3	0,63	0,14	2,2	8,2	0,02	2
9	7	0	4,3	0,64	0,14	2,2	8,4	0,01	2
10	0	0	2,3	0,36	0,17	1,1	5,1	0,3	1
10	0	1	2,7	0,43	0,17	1,2	5,9	0,06	1
10	1	0	2,8	0,44	0,17	1,3	6	0,70	1
10	1	1	3,2	0,51	0,17	1,5	7	0,19	1
10	1	2	3,8	0,58	0,17	1,7	8,3	0,03	2
10	2	0	3,3	0,52	0,17	1,5	7,3	0,96	1
10	2	1	3,9	0,59	0,17	1,7	8,6	0,31	1
10	2	2	4,6	0,66	0,17	2	10	0,06	1
10	3	0	4	0,60	0,18	1,8	9	1,00	1
10	3	1	4,7	0,68	0,18	2,1	11	0,46	1
10	3	2	5,6	0,75	0,18	2,5	13	0,11	1
10	3	3	6,6	0,82	0,17	3	15	0,02	2
10	4	0	4,9	0,69	0,18	2,1	11	1,00	1
10	4	1	5,9	0,77	0,18	2,6	13	0,61	1
10	4	2	7	0,84	0,17	3,2	16	0,19	1
10	4	3	8,2	0,91	0,16	3,8	17	0,05	2
10	5	0	6,2	0,79	0,18	2,7	14	1,00	1
10	5	1	7,4	0,87	0,18	3,3	17	0,77	1
10	5	2	8,7	0,94	0,17	4,1	19	0,32	1
10	5	3	10	1	0,16	4,9	21	0,09	1
10	5	4	12	1,1	0,15	5,8	23	0,02	2
10	6	0	7,9	0,9	0,18	3,5	18	1,00	1
10	6	1	9,4	0,97	0,17	4,3	20	0,98	1
10	6	2	11	1	0,16	5,2	23	0,46	1
10	6	3	12	1,1	0,15	6,2	25	0,15	1
10	6	4	14	1,1	0,14	7,2	27	0,04	2
10	7	0	10	1	0,17	4,6	22	0,94	1
10	7	1	12	1,1	0,16	5,6	25	1,00	1
10	7	2	14	1,1	0,15	6,7	28	0,6	1
10	7	3	15	1,2	0,15	7,9	30	0,24	1
10	7	4	17	1,2	0,14	9,1	33	0,08	1
10	7	5	19	1,3	0,14	10	36	0,02	2
10	8	0	13	1,1	0,16	6,1	28	0,72	1
10	8	1	15	1,2	0,16	7,3	31	1,00	1
10	8	2	17	1,2	0,15	8,6	35	0,83	1
10	8	3	20	1,3	0,15	10	38	0,42	1
10	8	4	22	1,3	0,14	12	42	0,16	1
10	8	5	25	1,4	0,14	13	47	0,05	2
10	9	0	17	1,2	0,16	8	36	0,54	1
10	9	1	20	1,3	0,16	9,6	41	1,00	1
10	9	2	23	1,4	0,15	11	46	1,00	1
10	9	3	26	1,4	0,15	13	53	0,62	1
10	9	4	30	1,5	0,15	15	60	0,3	1
10	9	5	35	1,5	0,15	17	69	0,12	1
10	9	6	40	1,6	0,15	20	78	0,04	2
10	9	7	46	1,7	0,15	23	90	0,01	2
10	10	0	24	1,4	0,17	11	53	0,30	1
10	10	1	29	1,5	0,17	13	64	0,67	1
10	10	2	35	1,5	0,18	15	79	0,90	1

Окончание таблицы С.7

Количество положительных результатов для инокулированного объема, $см^3$ или г			НВЧ/$см^3$ или /г	$\log_{10}M$	Стандартное отклонение $\log_{10}M$	95 % доверительные пределы		Индекс редкости	Категория
1	0,1	0,01				Нижний	Верхний		
10	10	3	43	1,6	0,18	18	100	1,00	1
10	10	4	54	1,7	0,19	23	130	1,00	1
10	10	5	70	1,8	0,19	29	170	1,00	1
10	10	6	92	2	0,18	40	210	1,00	1
10	10	7	120	2,1	0,17	54	270	1,00	1
10	10	8	160	2,2	0,17	73	350	1,00	1
10	10	9	230	2,4	0,18	100	520	1,00	1
10	10	10	∞	NA	NA	120	∞	1,00	1

Приложение D
(обязательное)

Подсчет колоний в случае двух чашек и одного разведения

D.1 Введение

Настоящее приложение устанавливает методы расчета и выражения результатов для подсчета с использованием на одно разведение.

Применяют все требования и рекомендации, установленные в 10.3.

В настоящем приложении представлены только отличающиеся разделы и те разделы, которые необходимы для понимания.

D.2 Подсчет колоний

Применяют требования и рекомендации, установленные в 10.3.1 и 10.3.2.1.1.

В соответствии с периодом термостатирования, установленном в конкретном стандарте, подсчитывают колонии (общие колонии, типичные колонии или предполагаемые подозрительные колонии) в каждой чашке, содержащей до 300 колоний включительно (или любое другое число, установленное в конкретном стандарте).

В данном подразделе рассматриваемые случаи соответствуют следующим общим случаям:

- посев на одной чашке Петри диаметром 90 мм для разведения; проводят как минимум два последовательных разведения;
- максимальное подсчитываемое число общих присутствующих колоний: 300 на чашку;
- максимальное общее число колоний (типичных и нетипичных), присутствующих в чашке в момент подсчета типичных и предполагаемых колоний: предпочтительно 300 на чашку;
- максимальное подсчитываемое число типичных или предполагаемых колоний: 150 на чашку;
- число предполагаемых колоний, инокулированных для идентификации или подтверждения (см. D.4) в каждой отобранной чашке: как правило, пять.

Эти цифры должны быть установлены в конкретных стандартах.

Ниже установленные методы подсчета предназначены для тех случаев, которые встречаются чаще всего в период проведения испытаний в соответствии с надлежащей лабораторной практикой. Иногда могут иметь место особые случаи (например, количество колоний в двух чашках Петри с одним и тем разведением могут демонстрировать существенное расхождение или отношение коэффициентов разбавления, используемых для двух последовательных разведений, может существенно различаться) и поэтому необходимо, чтобы при подсчете результатов опытный микробиолог провел исследование и интерпретацию и, при необходимости, забраковал их.

D.3 Метод расчета: общий случай (подсчет общего числа колоний или типичных колоний)

В целях достижения достоверного результата, как правило, является необходимым проводить подсчет колоний, по меньшей мере, на одной чашке, содержащей минимум 10 колоний [общих колоний, типичных колоний или колоний, соответствующих критериям идентификации или подтверждения (см. D.4)].

Если используют две чашки Петри на одно разведение, соотношение числа колоний, подсчитанных на первой чашке, и колоний, подсчитанных на второй чашке, должно быть равно 1.

Рекомендуется, чтобы для колоний, подсчитываемых на второй чашке, были установлены пределы в лаборатории.

Данные пределы могут являться пределами, установленными в [42].

В случае, когда данные пределы не соблюдаются, результат следует интерпретировать с осторожностью.

Пример 1 — Если подсчет колоний на первой чашке дал максимальное значение 250, то подсчет колоний на второй чашке должен дать минимальное значение 196 (см. [42]).

Рекомендации, касающиеся соотношения подсчетов колоний разведений d_1 и d_2, применимы (см. 10.3.2.2).

Рассчитывают число N микроорганизмов, присутствующих в анализируемой пробе как средневзвешенное двух последовательных разведений, по формуле D.1:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot [n_1 + (0{,}1 \cdot n_2)] \cdot d}, \qquad \text{(D.1)}$$

где ΣC — сумма колоний, подсчитанных на всех чашках, отобранных для двух последовательных разведений, при условии, что, по меньшей мере, одна чашка содержит минимум 10 колоний;

V — объем инокулята, использованного в каждой чашке, см^3;

n_1 — число чашек, отобранных для первого разведения;

n_2 — число чашек, отобранных для второго разведения;

d — коэффициент разбавления, соответствующий первому отобранному разведению [$d = 1$, если используют неразбавленный жидкий продукт (анализируемую пробу)].

Результат вычисления округляют до двух значащих цифр. Если третья цифра меньше пяти, предшествующую цифру не изменяют, если третья цифра больше или равна пяти, увеличивают предшествующую цифру на единицу.

Результат выражают предпочтительно как число от 1,0 до 9,9, умноженное на 10 в соответствующей степени, или целым числом, состоящим из двух значащих цифр.

Результат выражают следующим образом:

- число *N* микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов).

Пример 2 — Подсчет дал следующие результаты:

- В первом выбранном разведении (10^{-2}): 168 и 215 колоний;

- Во втором выбранном разведении (10^{-3}): 14 и 25 колоний.

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot [n_1 + (0{,}1 \cdot n_2)] \cdot d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \cdot [2 + (0{,}1 \cdot 2)] \cdot 10^{-2}} = \frac{422}{0{,}022} = 19182$$

Выполнив округление результатов в соответствии с вышеописанным, получаем число микроорганизмов, равное 19 000 или $1{,}9 \cdot 10^4$ на кубический сантиметр или на грамм продукта.

D.4 Метод расчета: случай, когда проведена идентификация или подтверждение

Если используемый метод требует идентификации, определенное количество *A* предполагаемых колоний (обычно пять) пересеивают с каждой чашки, отобранной для подсчета колоний. После идентификации рассчитывают для каждой чашки число *a* колоний, соответствующих критерию идентификации по формуле

$$a = \frac{b}{A} C \cdot \qquad \text{(D.2)}$$

где *b* — число колоний, соответствующих критериям идентификации, среди идентифицированных колоний *A*;

C — общее число предполагаемых колоний, подсчитанных в чашке.

Результат вычисления округляют до целого числа. Для этого, если первая цифра после запятой меньше пяти, предшествующую цифру не изменяют, если первая цифра после запятой больше или равна пяти, предшествующую цифру увеличивают на единицу.

Количество *N*, N_E, *N′* идентифицированных или подтвержденных микроорганизмов, присутствующих в анализируемой пробе, рассчитывают путем подстановки вместо ΣC значения Σa в формуле, приведенной в D.3, D.5.1 и D.7.3, соответственно.

Результаты округляют, как описано в D.3.

Результаты выражают, как описано в D.3, D.5.1 и D.7.3 соответственно.

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- в первом отобранном разведении (10^{-3}): 66 и 80 колоний;

- во втором отобранном разведении (10^{-4}): 4 и 7 колоний.

Тестирование отобранных колоний было выполнено следующим образом:

- из чашки с 66 колониями для идентификации было отобрано восемь колоний, из которых шесть колоний соответствовали критериям, следовательно, *a* = 50;

- из чашки с 80 колониями для идентификации было отобрано девять колоний, из которых шесть колоний соответствовали критериям, следовательно, *a* = 53;

- из чашки с 7 колониями для идентификации было отобрано пять колоний, из которых четыре колонии соответствовали критериям, следовательно, *a* = 6;

- из чашки с 4 колониями для идентификации было отобрано четыре колонии, все из которых соответствовали критериям, следовательно, *a* = 4.

$$N = \frac{\sum a}{V \cdot [n_1 + (0{,}1 \cdot n_2)] \cdot d} = \frac{50 + 53 + 6 + 4}{1 \cdot [2 + (0{,}1 \cdot 2)] \cdot 10^{-3}} = \frac{113}{0{,}0022} = 51364.$$

Округление результата выполняют в соответствии с D.3, количество микроорганизмов в пробе составило 51000 или $5{,}1 \cdot 10^4$ на кубический сантиметр или на грамм продукта.

D.5 Метод расчета: примерные количества

D.5.1 Случай двух чашек (с анализируемой пробой, начальной суспензией или первым разведением), содержащих менее 10 колоний

Требования и рекомендации, описанные в 10.3.2.4.1, касающиеся нижнего предела определения, применимы.

Если каждая из двух чашек с анализируемой пробой (жидкие продукты), с исходной суспензией (прочие продукты) или с первым разведением, засеянными или отобранными, содержит менее 10 колоний (общих колоний, типичных колоний или колоний, соответствующих критериям идентификации или подтверждения), и серия из двух чашек содержит по меньшей мере четыре колонии, рассчитывают примерное количество N_E микроорганизмов, присутствующих в анализируемой пробе, как среднеарифметическое числа колоний, подсчитанных на двух чашках, по формуле

$$N_E = \frac{\sum C}{Vnd}, \qquad (D.3)$$

где ΣC — сумма колоний, подсчитанных на двух чашках;

V — объем инокулята, использованного в каждой чашке, см^3;

n — число отобранных чашек (в данном случае, $n = 2$);

d — коэффициент разбавления исходной суспензии или первого отобранного разведения, посеянного или отобранного [$d = 1$, если используют неразбавленный жидкий продукт (анализируемую пробу)].

Результат округляют в соответствии с D.3.

Результат выражают следующим образом:

- примерное число N_E микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов).

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}): было подсчитано 8 и 9 колоний

$$N_E = \frac{8+9}{1 \cdot 2 \cdot 10^{-2}} = \frac{17}{0{,}02} = 850$$

Выполнив округление результатов в соответствии с D.3, получаем примерное число N_E микроорганизмов, равное 850 или $8{,}5 \times 10^2$ на кубический сантиметр или на грамм продукта.

D.5.2 Случай двух чашек (с анализируемой пробой, начальной суспензией или первым разведением), не содержащих колоний

В случае, если две чашки с анализируемой пробой (жидкие продукты), исходной суспензией (прочие продукты) или с первым разведением, засеянными или отобранными, не содержат никаких колоний, результат выражают следующим образом:

«менее $1/Vd$ микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов)»;

где V — объем инокулята, использованного в каждой чашке, см^3;

d — коэффициент разбавления исходной суспензии или первого разведения, посеянных или отобранных, [$d = 1$, если используют неразбавленный жидкий продукт (анализируемую пробу), $d = 0{,}1$, когда используют разведение 10^{-1} и т.д.].

D.6 Особые случаи (подсчет типичных или предполагаемых колоний)

D.6.1 Если количество всех типичных и атипичных колоний в двух чашках с первым разведением d_1 превышает 300 (или какое-либо другое число, установленное в соответствующем стандарте), среди которых наблюдаются типичные или подтвержденные (идентифицированные) колонии, и если в двух чашках, содержащих последующее разведение d_2, выявлено не более 300 колоний (или какого-либо другого числа, установленного в соответствующем стандарте) и не выявлено типичных или подтвержденных (идентифицированных) колоний, результат выражают следующим образом:

«менее $1/V_2d_2$ и более $1/V_1d_1$ микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов)»,

где V_1, V_2 — объемы инокулята, используемые в каждой чашке при каждом разведении d_1 и d_2, см^3;

d_1, d_2 — коэффициенты разбавления.

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 300 колоний на каждой из двух чашек, среди которых присутствуют типичные или подтвержденные колонии;

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 33 и 35 колоний, среди которых нет типичных или подтвержденных колоний.

Результат в пересчете на микроорганизмы будет меньше 1000 и больше 100 на кубический сантиметр или на грамм продукта.

D.6.2 Если количество всех типичных и атипичных колоний в двух чашках с первым разведением d_1 превышает 300 (или какое-либо другое число, установленное в соответствующем стандарте), среди которых не наблюдается типичных или подтвержденных (идентифицированных) колоний, и если в двух чашках, содержащих последующее разведение d_2, выявлено не более 300 колоний (или какого-либо другого числа, установленного в соответствующем стандарте) и не выявлено типичных или подтвержденных (идентифицированных) колоний, результат выражают следующим образом:

«менее $1/V_2d_2$ микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов)»,

где V_2 — объем инокулята, используемый в каждой чашке при каждом разведении d_2, см^3;

d_2 — коэффициент разбавления.

Пример – Подсчет дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 300 колоний на каждой из двух чашек, среди которых нет типичных или подтвержденных колоний;

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 33 и 35 колоний, среди которых нет типичных или подтвержденных колоний.

Результат в пересчете на микроорганизмы будет меньше 1000 на кубический сантиметр или на грамм продукта.

D.7 Метод расчета: особые случаи

Применимы требования и рекомендации, изложенные в 10.3.2.5.

D.7.1 Если количество подсчитанных колоний (общих колоний, типичных колоний или предполагаемых подозрительных колоний) превышает максимальное подсчитываемое число (300 или какое-либо другое число, установленное в соответствующем стандарте) для двух чашек, содержащих первое разведение d_1, с числом колоний (общих колоний, типичных колоний или колоний, соответствующих критериям идентификации или подтверждения) менее 10 (нижний предел подсчета) для двух чашек, содержащих второе разведение d_2, результаты выражают следующим образом:

Примечание — Пункты в данном подразделе приведены в качестве примера.

c) если число колоний для двух чашек с первым разведением d_1 попадает в интервал, например, 301–324 (максимальное подсчитываемое число плюс 1, верхний предел доверительного интервала для максимального подсчитываемого числа) (приложение B) и подсчет колоний для двух чашек для разведения d_2 дал результат не менее чем нижний предел, установленный в 10.3.2.2, используют метод вычисления для общих случаев (см. D.3.);

Пример 1 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 300, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено 310 и 322 колоний (меньше чем 324, верхнего предела доверительного интервала для 300);

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 8 и 12 колоний. Нижние пределы для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 18 и 19 колоний, установлены на основе 310 и 322 колоний разведения (10^{-2}).

Результат, полученный при данном подсчете колоний, неприемлем.

Пример 2 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 150, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено 151 и 160 колоний (меньше чем 167, верхнего предела доверительного интервала для 150);

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 8 и 9 колоний. Нижние пределы для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 6 и 7 колоний, установлены на основе 151 и 160 колоний разведения (10^{-2}).

Используют метод вычисления для общих случаев (D.3), используя отобранные чашки для двух разведений.

d) если число колоний для чашки с первым разведением d_1 превышает верхний предел доверительного интервала для максимального подсчитываемого количества (например, 324) и подсчет колоний для разведения d_2 для двух чашек дал результат не менее чем нижний предел, установленный в 10.3.2.2 и рассчитанный на основе верхнего предела доверительного интервала для максимального подсчитываемого количества, учитывают только результат подсчета для разведения d_2 и далее проводят примерный подсчет (см. D.5.1).

Пример 3 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 300, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 324 колоний в каждой из двух чашек;

- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено 7 и 9 колоний. Нижний предел для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 19 колоний, установлен на основе 324 колоний разведения (10^{-2}).

Результат, полученный при данном подсчете колоний, неприемлем.

Пример 4 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 150, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 167 колоний в двух чашках;

- во втором выбранном разведении (10^{-2}) выявлено 8 и 9 колоний. Нижний предел для подсчета колоний при данном разведении (10^{-2}) — 8 колоний, установлен на основе 167 колоний разведения (10^{-2}).

Оцененное число колоний записывают на основе колоний, подсчитанных в двух чашках для разведения (10^{-3}) (D.5.1).

Пример 5 — Подсчет (в случае, когда максимальное количество, равное 150, было установлено для подсчета колоний) дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 167 колоний в двух чашках;

- во втором выбранном разведении (10^{-2}) выявлено 5 и 7 колоний. Нижний предел для подсчета колоний при данном разведении (10^{-3}) — 8 колоний, установлен на основе 167 колоний разведения (10^{-2}).

Результат, полученный при данном подсчете колоний, неприемлем.

D.7.2 Если количество подсчитанных колоний (общее количество колоний, количество типичных колоний или количество презумптивных колоний) для каждой из чашек всех посеянных разведений дает значение свыше

300 (или любого другого числа, установленного в соответствующем стандарте), результат формулируют следующим образом:

«Более 300/*Vd*» (в случае общего числа или числа типичных колоний) или «Более (300/*Vd*) x (*b*/*A*) (в случае подтвержденных (идентифицированных) колоний), выраженных в количестве микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов),

где *d* — коэффициент разбавления последнего посеянного разведения;

V — объем инокулята, используемого в каждой чашке, см^3;

b — число колоний, соответствующих критериям идентификации среди посеянных колоний *A*.

D.7.3 Если можно произвести подсчет только в двух чашках с последним засеянным разведением, и они содержат не более 300 колоний (или любое другое количество, установленное в конкретном стандарте) — общее количество колоний, количество типичных колоний или количество презумптивных колоний — число *N′* присутствующих микроорганизмов вычисляют как среднеарифметическое числа колоний, посчитанных на двух чашках, по формуле

$$N' = \frac{\sum C}{V \cdot n \cdot d},$$

где ΣC — сумма колоний, подсчитанных на двух чашках, как минимум одна из которых содержит не менее 10 колоний;

V — объем инокулята, использованного в каждой чашке, см^3;

n — число отобранных чашек (в данном случае, *n* = 2);

d — коэффициент разбавления, соответствующий отобранному разведению

Результат округляют в соответствии с D.3.

За результат принимают число N микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов).

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

- в последнем засеянном разведении (10^{-4}) 120 и 130 колоний.

Таким образом,

$$N' = \frac{120 + 130}{1 \cdot 2 \cdot 10^{-4}} = \frac{250}{0{,}0002} = 1250000.$$

Округление результата проводят в соответствии с D.3, число N микроорганизмов равно 1 300 000 или $1{,}3 \cdot 10^6$ на кубический сантиметр или на грамм продукта.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 835	–	*
ISO 6887-1	IDT	ГОСТ ISO 6887-1—2015 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологического исследования. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений»
ISO 6887-2	–	*
ISO 6887-3	–	*
ISO 6887-4	–	*
ISO 6887-5	–	*
ISO 8199	–	*
ISO 8655 (все части)	–	*
ISO 11133	IDT	ГОСТ ISO/TS 11133-1—2014 «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 11133	IDT	ГОСТ ISO 11133-2—2011 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям питательных сред»
ISO 16140-2	–	*
ISO 19036	–	*
ISO 22174	–	*

*Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:
IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] Bell, C. Neaves, P. and Williams, A.P. Food microbiology and laboratory practice, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK (2005)

[2] ISO 9001 Системы менеджмента качества. Общие требования

[3] EA-Guidelines for the use of computers and computer systems in accredited laboratories, European cooperation for Accreditation (1998)

[4] EA-4/10, Accreditation for microbiological laboratories, European cooperation for Accreditation (2002)

[5] Food microbiology program requirements, based upon the FLAWG document United States accreditation criteria for laboratories performing food microbiological testing, American Association for Laboratory Accreditation (A2LA) (1998)

[6] AS 1766 Австралийские стандартные методы микробиологических исследований пищевых продуктов. Часть 1: Современные общие приемы и методики

[7] Buttiaux, R., Beerens, H. and Tacquet, A. Manuel de techniques bactériologiques, Éditions Médicales Flammarion (4th edn.)

[8] APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2nd edition, Speck, M.L., editor. Intersociety/Agency Committee on Microbiological Methods for Foods, American Public Health Association, Washington, DC, 1984

[9] Cruickshank et al., Medical microbiology, Vol. 2, 12th edn., Churchill Livingstone, Edinburgh (1975)

[10] D'Aoust, J.Y. Psychrotrophy and foodborne Salmonella. Int. J. Food. Microbiol. 1991, 13, pp. 207 — 16

[11] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and McDonald, C. Recovery of Salmonella spp. from refrigerated pre-enrichment cultures of dry food composites, J. AOAC Int. 1995, 78, pp. 1322 — 7

[12] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Greco, P. Detection of Salmonella in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures: summary of collaborative study. J. AOAC. Int. 1994, 77, pp. 1490 — 1

[13] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Greco, P. Detection of Salmonella in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures — Interlaboratory study, J. AOAC. Int. 1993, 76, pp. 814 — 21

[14] Dalsgaard, A., Guardabassi, L., Lund, C., Bagge, L. and Gravesen, J. Opbevaring af badevands-og drikkevandsprøver ved 0 — 5 °C i et døgn medfører en signifikant reduktion i antal Escherichia coli og kimtal, Dansk. Vet. 2002 17, pp. 1 — 9

[15] Harrewijin, G.A., and Hartog, B.J. Guidelines to perform microbiological analyses of food and food products («Good laboratory practice»), De Ware(n)-Chemicus 1979, 9, pp. 1 — 11

[16] Muir, G.D., ed. Hazards in the chemical laboratory, Royal Institute of Chemistry, London (1971)

[17] WHO. Laboratory biosafety manual, 3rd edition. Geneva: World Health Organization, 2004. 184 p. Available (viewed 2013-01-24) at: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf

[18] Lightfoot, N.F., Maier, E.A. (eds). Microbiological analysis of food and water — Guidelines for quality assurance. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1998)

[19] Harrigan, W.F. and McCance, M.E. Laboratory methods in food and dairy microbiology, Academic Press (1976)

[20] Laboratory safety at the Centers for Disease Control (CDC), NHEW Publication No. CDC 79-8118, Atlanta, 1979

[21] Laboratory safety at the Centers for Disease Control, US Dept of Health, Education and Welfare (Public Health Service), Atlanta, 1979

[22] Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costillow, R.N., Nester, E.W., Krieg, N.R. and Phillips, G.B. eds. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC 20006 (1981)

[23] Gnanou Besse, N., Audinet, N., Beaufort, A., Colin, P., Cornu, M. and Lombard, B. A contribution to the improvement of Listeria monocytogenes enumeration in cold-smoked salmon. Int. J. Food Microbiol. 2004, 91, pp. 119 — 27

[24] Microbiological testing laboratory accommodation guidelines, National Association of Testing Authorities, Australia

[25] Microorganisms in foods — 1: Their significance and methods of enumeration, ICMSF, University of Toronto Press (1968 update)

[26] Shapton, D.A., Board, R.G. and Hauster, W.J. eds. Safety in microbiology, Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 1 and No. 6, Academic Press (1972)

[27] De Man, J.C. MPN tables (corrected), Eur. J. Appl. Biotechnol. 1983, 17, pp. 301 — 5

[28] Cochran, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the «Most Probable Number». Biometrics 1950, 6, pp. 105 — 16

[29] Hurley, M.A. and Roscoe, M.E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series, J. Appl. Bacteriol. 1983, 55, pp. 159 — 64

[30] Niemela, S. Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Report No. 1, 2nd edition (1983)

[31] Taylor, J. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series, J. Appl. Bacteriol. 1962, 25, pp. 54 — 61

[32] Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edn., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1994)

[33] Krieg, N.R. and Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology — Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984)

[34] Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology — Volume 2, 2nd edition, Springer, New York, NY, 2001

[35] Kreger-van Rij, N.J.W. The yeasts — A taxonomic study, 3rd edn., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands

[36] Thomas, H.A. Bacterial densities from fermentation tube tests, J. Am. Water Works Assoc. 1942, 34, pp. 572 — 6

[37] ISO/IEC Guide 43-1, Проверка квалификации путем межлабораторных сличений. Часть 1. Разработка и применение программ проверок компетентности лабораторий

[38] ISO 6888 (все части) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета коагулазаположительных стафилококков (Staphylococcus aureus и другие виды)

[39] ISO 9998 Качество воды. Методика оценки и контроля микробиологической среды для подсчета колоний при оценочных испытаниях качества воды

[40] ISO/TR 13843 Качество воды. Руководство по валидации микробиологических методов

[41] ISO 14461-1 Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 1. Оценка работы аналитика при подсчете числа колоний

[42] ISO 14461-2 Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 2. Определение достоверности подсчета числа колоний при посеве на параллельных чашках Петри с последующими стадиями разведения

[43] ISO 16654 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения палочки Escherichia coli O157

[44] ISO/IEC 17025:2005 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

[45] EN 12469 Биотехнология. Критерии качества для боксов биологической безопасности

[46] ISO 17604 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Отбор проб для микробиологического анализа из туши

[47] ISO 18593 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальные методы отбора проб с поверхностей с помощью контактных пластинок и тампонов

[48] ISO Guide 99:1996 Международный словарь по метрологии. Основные и общие понятия и соответствующие термины (VIM)

[49] ISO/TC 34/SC 9 N852 Supporting document on the change from two to one plate per dilution for colony-count techniques (revision of ISO 7218), June 2007, Marie Cornu

[50] ISO 3696, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods

[51] ISO 7712, Laboratory glassware — Disposable Pasteur pipettes

[52] Blodgett R.J. Serial dilution with a confirmation step. Food Microbiol. 2005, 22, pp. 547 — 552

[53] Blodgett R.J. Appendix 2: Most probable number from serial dilutions. In: Bacterial analytical manual online. Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, 2010. Available (viewed 2013-02-04) at:
gost.e-ecolog.ru
/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm

[54] Garthright W.E., Blodgett R.J. FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. Food Microbiol. 2003, 20, pp. 439 — 445

[55] Haldane J.B.S. Sampling errors in the determination of bacterial or virus density by the dilution method. J. Hygiene 1939, 39, pp. 289 — 293.

[56] Jarvis B., Wilrich. C., Wilrich P.T. Reconsideration of the derivation of most probable numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. J Appl. Microbiol. 2010, 109, pp. 1660 — 1667

[57] ISO 80000-2:2009, Quantities and units — Part 2: Mathematical signs and symbols to be used in the natural sciences and technology

УДК 579.67:006.354 МКС 07.100.30

Ключевые слова: пищевые продукты, корма для животных, микробиологические исследования, отбор проб, испытуемые пробы, пипетки, чашки Петри, агар, питательные среды, колонии, оборудование для исследования, общие правила к применению, стерилизация, деконтаминация, наиболее вероятное число

Редактор *К.В. Дудко*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *А.В. Балеановича*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 8,84. Тираж 83 экз. Зак. 3837.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru