МКС 13.060.50

к СТБ ISO 7218-2010 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования к выполнению микробиологических исследований

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Библиографические данные	МКС 13.060.50	МКС 07.100.30

(ИУ ТНПА № 1-2012)

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 7218-2010

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Общие требования к выполнению микробиологических исследований

МІКРАБІЯЛОГІЯ ХАРЧОВЫХ ПРАДУКТАЎ І КАРМОЎ ДЛЯ ЖЫВЁЛЫ

Агульныя патрабаванні да выканання мікрабіялагічных даследаванняў

(ISO 7218:2007, IDT)

Издание официальное

БЗ 9-2009



Госстандарт
Минск

УДК [579.67+579.64](083.74)(476) МКС 13.060.50 КП 03 IDT

Ключевые слова: микробиологические исследования, микроорганизм, категория риска, азотная кислота, метод извлечения, мокрое разложение, раствор

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 20 мая 2010 г. № 23

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство по микробиологическим исследованиям).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 9 «Микробиология» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO) совместно с техническим комитетом по стандартизации CEN/TC 275 «Анализ пищевой продукции. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВЗАМЕН СТБ ГОСТ Р 51446-2001 (ИСО 7218-96)

© Госстандарт, 2010

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

Введение VI
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Помещения и оборудование 2
3.1 Общие требования 2
3.2 Требования безопасности 2
3.3 Планировка лаборатории 3
3.4 Зоны лаборатории 3
3.5 Расположение и оборудование помещений 3
3.6 Чистка и дезинфекция 5
4 Персонал 5
4.1 Общие требования 5
4.2 Компетентность 5
4.3 Проверки текущей компетентности персонала 5
4.4 Гигиена 5
5 Приборы и оборудование 6
5.1 Общие требования 6
5.2 Защитные боксы 6
5.3 Весы и гравиметрические разбавители 8
5.4 Гомогенизаторы и смесители 8
5.5 pH-метр 9
5.6 Автоклав 10
5.7 Средоварка 11
5.8 Термостат 11
5.9 Холодильник, холодильная камера 12
5.10 Морозильная камера и камера глубокой заморозки 13
5.11 Баня с терморегулятором 13
5.12 Пропариватели, в том числе водяные бани 14
5.13 Стерилизационный шкаф 15
5.14 Микроволновая печь 15
5.15 Машина для мойки стеклянной посуды 16
5.16 Оптический микроскоп 16
5.17 Газовая горелка или прокаливатель проволоки 17
5.18 Дозатор питательных сред и реактивов 17
5.19 Механический смеситель типа Вортекс 18
5.20 Прибор для подсчета колоний 18
5.21 Оборудование для культивирования в модифицированной атмосфере 19
5.22 Центрифуга 19
5.23 Нагревательная плитка и нагревательный кожух 20
5.24 Автоматический аппарат для спирального посева 20
5.25 Дистилляторы, деионизаторы и обратноосмотическое оборудование 21
5.26 Таймеры и устройства отсчета времени 21
5.27 Пипетки и пипетторы 22
5.28 Термометры и устройства контроля температуры, включая автоматические регистраторы 23
5.29 Иммуномагнитный сепаратор 24
5.30 Система фильтрации 24
5.31 Прочее оборудование и программное обеспечение 24
6 Подготовка стеклянной посуды и прочих лабораторных материалов 24
6.1 Подготовка 24
6.2 Стерилизация (обеззараживание) 25
6.3 Одноразовое оборудование и материалы 25
6.4 Хранение чистой стеклянной посуды и материалов 25
6.5 Содержание стерильной стеклянной посуды и материалов 25
6.6 Порядок обеззараживания и дезинфекции 25

6.7 Утилизация отходов 26
6.8 Мойка 26
7 Приготовление и стерилизация питательных сред 26
8 Лабораторные пробы 26
8.1 Отбор проб 26
8.2 Транспортирование 27
8.3 Приемка 27
8.4 Хранение 28
8.5 Навеска пробы 28
9 Исследования 28
9.1 Гигиенические меры предосторожности при проведении исследований 28
9.2 Приготовление первичной суспензии и разведений 29
10 Определение количества микроорганизмов 30
10.1 Общие требования 30
10.2 Подсчет микроорганизмов с использованием плотной питательной среды 30
10.3 Расчет и выражение результатов, получаемых на плотных средах 33
10.4 Определение количества дрожжей и плесневых грибков 37
10.5 Подсчет с использованием жидкой среды 38
11 Метод обнаружения (качественный метод) 42
11.1 Общие требования 42
11.2 Принцип 42
11.3 Измерение неопределенности 43
12 Методы подтверждения 43
12.1 Общие требования 43
12.2 Приготовление чистой культуры 43
12.3 Окрашивание по Граму (модифицированный метод Хаккера) 43
12.4 Использование биохимических наборов для целей идентификации 44
12.5 Использование нуклеиновых зондов для целей идентификации 45
12.6 Серологические методы 45
13 Протокол испытаний 46
14 Валидация микробиологических методов 46
14.1 Валидация эталонных методов 46
14.2 Валидация альтернативных методов 46
14.3 Валидация внутренних методов лаборатории 46
15 Обеспечение качества результатов (управление качеством работ) 46
15.1 Внутреннее управление качеством 46
15.2 Эталонные штаммы 47
15.3 Внешняя оценка качества (проведение проверок на качество проведения испытаний) 47
Приложение А (справочное) Характеристики некоторых дезинфицирующих средств 43
Приложение В (обязательное) Определение наиболее вероятного числа (НВЧ) 49
Библиография 54

Введение

При проведении микробиологических исследований особенно важно следить за тем, чтобы:

– изолировались и подвергались подсчету только те микроорганизмы, которые присутствуют в пробе;

– микроорганизмы не заражали окружающую среду.

Для этой цели необходимо уделять внимание личной гигиене и использованию таких методов работы, которые исключают, насколько это возможно, заражение внешней среды.

Поскольку настоящий стандарт позволяют привести лишь отдельные примеры мер предосторожности, подлежащих соблюдению в ходе микробиологических исследований, для его применения существенным является хорошее знание применяемых при этом методик и изучаемых микроорганизмов. Важно, чтобы исследования проводились с как можно большей тщательностью, в том числе это касается контроля и регистрации данных, которые могут оказать влияние на получаемые результаты, расчет количества микроорганизмов и неопределенность этих результатов.

В конечном счете на руководителе лаборатории лежит ответственность за принятие решений о том, являются ли те или иные операции безопасными и могут ли они рассматриваться как надлежащая лабораторная практика.

Например, многие выполняемые операции могут привести к непреднамеренному перекрестному заражению, соответственно, аналитик должен всегда контролировать точность результатов, получаемых при использовании его методики.

Для правильного проведения исследований некоторые специальные меры должны быть приняты еще на этапе строительства и оборудования помещений лаборатории.

Отдельные меры предосторожности необходимо соблюдать не только в целях гигиены, но и для обеспечения хорошей воспроизводимости результатов. Описание всех мер, принимаемых при различных обстоятельствах, не представляется возможным, однако настоящий стандарт как минимум определяет основные виды мер, которые следует принимать в процессе подготовки, стерилизации, хранения сред и эксплуатации оборудования.

Выполнение требований настоящего стандарта должно способствовать также обеспечению здоровья и безопасности персонала. Дополнительная информация по этому вопросу приведена в литературе согласно библиографическому списку.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ
Общие требования к выполнению микробиологических исследований

МІКРАБІЯЛОГІЯ ХАРЧОВЫХ ПРАДУКТАЎ І КАРМОЎ ДЛЯ ЖЫВЁЛЫ
Агульныя патрабаванні да выканання мікрабіялагічных даследаванняў

Microbiology of food and animal feeding stuffs
General requirements and guidance for microbiological examinations

Дата введения 2011-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на микробиологические исследования пищевых продуктов, кормов для животных, а также производственной среды при производстве продуктов питания и на этапе первичного производства.

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к выполнению микробиологических исследований, направленные на выполнение трех основных задач:

– реализацию требований стандартов, подготовленных ISO/TC 34/SC 9 или ISO/TC 34/SC 5, содержащих требования по обнаружению присутствия микроорганизмов или определению их количества, далее называемых специализированными стандартами;

– внедрение надлежащей лабораторной практики для лабораторий, которые выполняют микробиологические исследования пищевой продукции (настоящий стандарт не предполагает их детального описания, для этой цели имеются отдельные руководства);

– определение порядка аккредитации лабораторий, которые проводят микробиологические исследования пищевой продукции (настоящий стандарт описывает технические требования по аккредитации микробиологических лабораторий национальными органами по аккредитации в соответствии с приложением B ISO/IEC 17025:2005).

Дополнительные указания по выполнению исследований в области молекулярной биологии приведены в ISO 22174.

Настоящий стандарт распространяется на исследования бактерий, дрожжей и плесневых грибков, кроме того, он может быть использован для исследований прионов, паразитов и вирусов, если будет подкреплен специальными указаниями. Настоящий стандарт не распространяется на исследование токсинов либо иных метаболитов микроорганизмов (например, аминов).

Настоящий стандарт может оказать содействие при проведении процедуры признания результатов испытаний пищевой продукции, а также гарантирует, что общие методики, используемые при проведении данных исследований, одинаковы для всех лабораторий, способствует достижению сопоставимых результатов испытаний, полученных в разных лабораториях, и вносит вклад в обеспечение безопасности персонала лаборатории за счет предотвращения рисков распространения инфекции.

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 835:2007 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки мерные градуированные

ISO 6887-1:1999 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятичных разведений

Издание официальное

ISO 6887-2:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила для подготовки мяса и мясных продуктов

ISO 6887-3:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для подготовки рыбы и рыбных продуктов

ISO 6887-4:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для подготовки продуктов, кроме молока и молочных продуктов, мяса и мясных продуктов и рыбы и рыбных продуктов

ISO 8199:2005 Качество воды. Общее руководство по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде

ISO 8261:2001 Молоко и молочные продукты. Общее руководство по подготовке испытательных проб, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологического исследования

ISO 8655-1:2002 Устройства мерные поршневые. Часть 1. Терминология, общие требования и рекомендации для пользователя

ISO/TS 11133-1:2009 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по подготовке и приготовлению культуральных сред. Часть 1. Общее руководство по обеспечению качества подготовки культуральных сред в лаборатории

ISO/TS 11133-2:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по подготовке и приготовлению культуральных сред. Часть 2. Практическое руководство по тестированию эффективности культуральных сред

ISO 16140:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов

ISO/TS 19036:2006 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по оценке неопределенности измерения для количественных определений

ISO 22174:2005 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (PCR) для обнаружения пищевых патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения

3 Помещения и оборудование

3.1 Общие требования

В настоящем разделе изложены общие требования к размещению микробиологической лаборатории, в том числе принципы ее планировки и организации.

Исследования проб, отобранных на этапе первичного производства (особенно в части приемки и подготовки проб), должны проводиться отдельно от исследований остальных проб в целях снижения рисков перекрестного заражения.

3.2 Требования безопасности

Планировка лаборатории должна соответствовать требованиям безопасности, которые зависят от типа исследуемых микроорганизмов, подразделенных на четыре категории риска:

1-я категория риска (отсутствие риска или очень низкий уровень риска для отдельного лица и для населения).

Микроорганизм с малой вероятностью может вызвать заболевание у человека или животных.

2-я категория риска (умеренный уровень риска для отдельного лица, низкий уровень риска для населения).

Патогенный микроорганизм, способный вызвать заболевание у человека или животных, однако маловероятно, что он представляет значительную угрозу для сотрудников лаборатории, для населения или для окружающей среды. Контакт с ним в пределах лаборатории может привести к серьезному заражению человека, однако доступны эффективное лечение и необходимые профилактические меры, а вероятность распространения инфекции ограничена.

3-я категория риска (высокий уровень риска для отдельного лица, низкий уровень риска для населения).

Патогенный микроорганизм, вызывающий серьезные заболевания у человека или животных, однако обычно не передающийся от одного зараженного лица или животного к другому. Доступны эффективное лечение и необходимые профилактические меры.

4-я категория риска (высокий уровень риска для отдельного лица и для населения).

Патогенный микроорганизм, вызывающий серьезные заболевания у человека или животных и легко передающийся от одного человека или животного к другому прямым или непрямым путем. Эффективное лечение и необходимые профилактические меры не всегда доступны.

Внимание! Общее размещение лаборатории и ее инфраструктура должны удовлетворять требованиям действующих на территории Республики Беларусь санитарных правил, устанавливающих группу риска для микроорганизмов.

3.3 Планировка лаборатории

Указания по планировке лаборатории, приведенные ниже, распространяются на исследования микроорганизмов, отнесенных к 1, 2 и 3-й категориям риска для микробиологических испытаний пищевой продукции.

Следует отметить, что в соответствии с национальными требованиями могут приниматься дополнительные меры безопасности.

3.4 Зоны лаборатории

3.4.1 Общие требования

Лаборатория включает в себя зоны для работы с пробами и проведения испытаний (см. 3.4.2) и зоны общего назначения (см. 3.4.3). Эти зоны должны быть отделены друг от друга.

3.4.2 Зоны для работы с пробами и проведения испытаний

Надлежащей практикой признается наличие отдельных помещений или четко обозначенных зон для таких целей, как:

– приемка и хранение проб;

– подготовка проб, особенно в случае с сырыми материалами (например, порошкообразными продуктами, содержащими большое количество микроорганизмов);

– исследования проб (из первичной суспензии), включая инкубирование микроорганизмов;

– выполнение действий над предполагаемыми патогенными микроорганизмами;

– хранение эталонных и прочих штаммов;

– подготовка и стерилизация питательных сред и оборудования;

– хранение питательных сред и реактивов;

– контроль стерильности пищевой продукции;

– обеззараживание;

– чистка стеклянной посуды и прочего оборудования;

– хранение опасных химикатов, предпочтительно в специальных ящиках, шкафах, помещениях или зданиях.

3.4.3 Зоны общего назначения

Отдельно должны быть определены следующие зоны:

– тамбуры, коридоры, лестничные пролеты, лифты;

– административные зоны (например, секретарские и офисные комнаты, помещения для хранения документации и т. д.);

– раздевалки и туалеты;

– архивные помещения;

– складские помещения;

– комнаты отдыха.

3.5 Расположение и оборудование помещений

3.5.1 Задачи

Задача состоит в том, чтобы гарантировать, что среда, в которой проводятся микробиологические исследования, не оказывает отрицательного влияния на результаты испытаний.

Помещения должны располагаться таким образом, чтобы избежать риска перекрестного заражения. Например, для этой цели можно:

а) при планировке строящейся лаборатории использовать принцип «движение только в одном направлении»;

b) выполнять действия последовательно, с соблюдением предосторожностей, необходимых для обеспечения чистоты эксперимента и сохранности проб (например, с использованием герметичных контейнеров);

c) разделять виды деятельности во времени и пространстве.

Следует избегать экстремальных условий, таких как избыточные значения температуры, запыленности, влажности, образования пара, шума, вибрации и т. д.

Площадь рабочих зон должна быть достаточной, чтобы содержать их в чистоте и порядке. Необходимое пространство должно отвечать объему выполняемых анализов и общей внутренней организации лаборатории. Его количество должно соответствовать национальным требованиям.

3.5.2 Оборудование помещений

Чтобы снизить риск загрязнения пылью и, соответственно, заражения микроорганизмами (для микроорганизмов, относящихся к 3-й категории риска, с учетом действующих на территории Республики Беларусь санитарных правил, устанавливающих группу риска для микроорганизмов), устройство и оборудование помещений должны быть следующими:

a) стены, потолки и полы должны быть гладкими, легко поддающимися чистке и уборке и устойчивыми к растворителям и средствам дезинфекции, используемым в лаборатории;

b) полы не должны быть скользкими;

c) трубы, по которым подаются жидкости, не должны проходить через помещения, за исключением случаев, когда эти трубы герметично изолированы. Компоненты других систем с воздушной разводкой должны закрываться кожухами или обеспечивать легкий доступ для их регулярной чистки;

d) должна быть возможность закрывать окна и двери на время проведения испытаний во избежание сквозняков. Кроме того, их конструкция должна препятствовать скоплению пыли и облегчать чистку. Температура окружающего воздуха (от 18 °C до 27 °C) и его качество (содержание микроорганизмов, запыленность и т. д.) должны соответствовать требованиям, предъявляемым к проведению испытаний. Для этой цели рекомендуется использовать систему вентиляции с фильтрами для поступающего и выходящего воздуха;

e) в помещениях должна быть оборудована соответствующая система вытяжной вентиляции для удаления пыли, образующейся при работе с дегидратированной питательной средой, а также с запыленными или порошкообразными пробами;

f) если для испытаний требуется очень чистая атмосфера, то помещение должно быть оборудовано ламинарным шкафом с очисткой воздуха и (или) безопасным боксом;

g) при необходимости лабораторная среда должна быть защищена от нежелательного солнечного излучения с помощью жалюзи или специально обработанных стеклянных панелей. Внутренние шторы и ставни не подходят для этой цели, поскольку могут создавать трудности при чистке и могут являться источниками пыли.

3.5.3 Прочие требования

Необходимо учитывать следующие требования:

– должен быть водопровод, качество воды в котором соответствует ее назначению;

– должно быть электроснабжение;

– должен быть источник газа (трубопровода или баллонов);

– должно быть надлежащее освещение в каждом секторе лаборатории;

– лабораторные столы и мебель должны быть изготовлены из гладкого, непроницаемого материала, который легко поддается очистке и дезинфекции;

– лабораторная мебель должна быть такой конструкции, чтобы она не затрудняла уборку полов (например, передвижной мебели);

– в испытательных зонах недопустимо нахождение мебели, документов или других предметов, кроме тех, которые обязательно необходимы для проведения испытаний;

– должны быть отдельные места для хранения документов, применяемых при работе с пробами, питательной средой, реактивами и т. п.;

– должны быть рукомойники в каждом испытательном помещении и при необходимости в зонах общего назначения, желательно вблизи дверей;

– должен быть автоклав для уничтожения зараженных отходов и питательной среды, если в лаборатории отсутствует соответствующая система сбора зараженных отработанных материалов для их дальнейшего сжигания;

– должны быть системы безопасности на случай возгорания или аварии электрооборудования, а также должен быть душ и приспособления для промывки глаз в экстренной ситуации;

– должна быть аптечка первой помощи.

3.6 Чистка и дезинфекция

Следует контролировать выполнение следующих требований:

a) полы, стены, потолки, лабораторные столы, мебель и стыки между ними должны подвергаться регулярному уходу и ремонту во избежание появления щелей и трещин, которые могут являться источником заражения;

b) должны проводиться регулярная чистка и дезинфекция для поддержания в помещениях условий, пригодных для проведения испытаний. Зараженные или потенциально зараженные поверхности должны обеззараживаться с использованием дезинфицирующего средства, о котором известно, что оно обладает как антибактериальными, так и фунгицидными свойствами.

Примечание 1 – Помещения и оборудования могут обеззараживаться путем фумигации с использованием паров формальдегида, если это допускается национальными требованиями;

c) системы вентиляции и их фильтры должны подвергаться регулярному техническому обслуживанию, фильтры при необходимости должны заменяться;

d) микробиологические характеристики рабочих поверхностей в лаборатории и поверхностей, с которыми контактирует персонал лаборатории, а также качество воздуха должны регулярно контролироваться (периодичность зависит от результатов предшествующих испытаний);

e) для того чтобы определить заражение поверхности, можно непосредственно приложить к ней контактную пластину с содержанием подходящих реактивов, которые нейтрализуют действие дезинфицирующих веществ (например, лецитина, тиосульфата натрия). Качество воздуха может быть установлено путем экспонирования в течение 15 мин открытой чашки Петри, содержащей неселективную агаровую среду (например, агар для чашечного подсчета – PCA) или селективный агар для предполагаемого целевого организма (например, плесени).

Примечание 2 – Для определения загрязнения поверхностей и воздуха могут использоваться также другие методы, см. ISO 18593.

4 Персонал

4.1 Общие требования

Общие требования к компетентности персонала представлены в ISO/IEC 17025.

4.2 Компетентность

Для каждого метода или методики должны быть определены объективные критерии как первичной, так и выполняемой на постоянной основе оценки соответствующей компетентности.

Компетентность может устанавливаться в рамках внутреннего контроля качества лаборатории (см. 15.1.2).

Примечание – Один из способов выяснения причин неудовлетворительных показателей (пипеттирование, недостаточная однородность первичной суспензии, процедура подсчета и т. п.) при подсчете колоний описывается в ISO 14461-1.

4.3 Проверки текущей компетентности персонала

По проверкам текущей компетентности персонала должна даваться регулярная оценка на основе объективных параметров. Сюда относятся: участие во внутренних программах обеспечения качества, проверках на качество проведения испытаний (см. ISO/IEC Guide 43-1), использование стандартных образцов или испытания с целью самооценки при подсчете микроорганизмов, как описано в ISO 14461-2.

4.4 Гигиена

Что касается гигиены персонала, то во избежание заражения проб и питательных сред, а также для предупреждения инфицирования персонала должны приниматься меры предосторожности, приведенные ниже:

a) в лаборатории необходимо носить тщательно застегнутую лабораторную спецодежду, чистую и в хорошем состоянии, изготовленную из трудновоспламеняемого материала. Эту спецодежду не следует использовать за пределами рабочих зон и в гардеробах;

b) волосы на голове и бороду необходимо покрывать, если это требуется для обеспечения сохранности проб;

c) ногти следует содержать в чистоте и по возможности коротко остригать;

d) руки следует тщательно мыть теплой водой, предпочтительно из-под крана, регулируемого без помощи рук, – перед проведением микробиологических исследований и после них, а также непосредственно после посещения туалета. Необходимо использовать жидкое или порошкообразное мыло или дезинфицирующее средство. Предпочтительно, чтобы они подавались из дозирующего устройства, которое следует содержать на должном уровне чистоты. Для сушки рук необходимо использовать одноразовые бумажные салфетки или одноразовые матерчатые полотенца. Данные меры предосторожности распространяются как на персонал, так и на посетителей лаборатории;

e) при работе с открытыми пробами, культурами, средами и в процессе посева не следует разговаривать, кашлять и т. д.;

f) специальные меры предосторожности должны принимать лица с кожными инфекциями или заболеваниями, если их возбудители могут заразить пробы и сделать недействительными результаты испытаний;

g) в лаборатории не следует принимать еду и питье и хранить пищевые продукты, предназначенные для личного потребления, в лабораторных холодильниках и морозильниках;

h) запрещается набирать жидкость в пипетку ртом.

5 Приборы и оборудование

5.1 Общие требования

В соответствии с надлежащей лабораторной практикой все приборы и оборудование лаборатории должны содержаться в чистоте и в надлежащем рабочем состоянии. Перед использованием оборудование следует поверить в соответствии с назначением, а его рабочие характеристики при необходимости должны контролироваться в процессе эксплуатации.

Если требуется, оборудование и контрольные устройства должны калиброваться, чтобы обеспечить прослеживаемость к национальным эталонам, кроме того, должны производиться повторные калибровки и выполняться любые необходимые промежуточные проверки, а их методики и результаты должны документироваться.

Оборудование необходимо регулярно поверять и обеспечивать за ним уход, чтобы гарантировать его безопасность и пригодность к использованию. Оборудование должно контролироваться в соответствии с рабочими условиями, а к результатам должно предъявляться требование точности.

Периодичность калибровки и поверки каждой единицы оборудования в большинстве случаев не устанавливается настоящим стандартом, поскольку каждая лаборатория определяет их самостоятельно, в зависимости от типа оборудования и уровня активности лаборатории и в соответствии с инструкциями изготовителя. В ограниченном количестве случаев периодичность оговаривается, если признано, что она имеет существенное значение.

Конструкция и способ установки приборов и оборудования должны обеспечивать их работу и облегчать их техническое обслуживание, чистку, обеззараживание и калибровку.

Любые значения неопределенности измерения, приведенные в настоящем разделе, относятся к упомянутым приборам и оборудованию и не затрагивают метод анализа в целом.

На протяжении всего настоящего раздела даются рекомендации по точности измерения для измерительного оборудования. Они основаны на практических значениях допусков, необходимых для подтверждения надлежащего контроля над оборудованием в процессе его повседневного применения. Указываемое значение точности относится к метрологической неопределенности оборудования (см. ISO Guide 99).

В случае с оборудованием для контроля температуры проверяют стабильность и однородность значения температуры перед началом использования и после всякого ремонта или модификации, которые могут оказать влияние на контроль температуры.

5.2 Защитные боксы

5.2.1 Описание

Защитный бокс или боксированное помещение представляют собой рабочее место с горизонтальным или вертикальным ламинарным воздушным потоком для удаления из воздуха пыли и прочих частиц, таких как микробы.

Максимальное допускаемое количество частиц с размерами, равными или превышающими 0,5 мкм/м^3, определяет класс очистки от пыли для соответствующего защитного бокса. У боксов, используемых для целей микробиологических исследований пищевых продуктов, количество частиц не должно превышать 4 000 на м^3.

Боксы, которые рассчитаны на использование в лабораториях пищевой микробиологии, делятся на четыре типа.

a) I класс безопасности представлен открытыми спереди, защищенными от выбросов боксами, которые должны обеспечивать безопасность оператора и окружающей среды, однако не защищают от внешнего заражения сам продукт. Потенциально зараженные аэрозоли остаются внутри бокса и улавливаются по достижении ими фильтра. Прошедший фильтрацию воздух обычно выбрасывается в атмосферу; в противном случае воздух должен пройти через два последовательно подключенных HEPA-фильтра. Использовать такие боксы не рекомендуется при работе с патогенными микроорганизмами 3-й категории риска ввиду трудности обеспечения и поддержания безопасных условий для оператора.

b) Боксы II класса безопасности обеспечивают защиту продукции, оператора и окружающей среды. Часть профильтрованного воздуха они рециркулируют, другую часть выпускают в атмосферу, забирая новую порцию воздуха через рабочее окно и защищая тем самым оператора. Они подходят для работы с патогенными микроорганизмами 3-й категории риска.

c) Боксы с горизонтальным исходящим ламинарным потоком воздуха защищают рабочую область от загрязнения, однако выдувают все образующиеся аэрозоли в лицо оператору. Как следствие, они не подходят для работы с посеянными культурами или для приготовления тканевой культуры.

d) Боксы с вертикальным исходящим ламинарным потоком воздуха защищают продукт посредством вертикального ламинарного потока воздуха, пропущенного через фильтр HEPA. Кроме того, они защищают оператора благодаря применению внутренней рециркуляции воздуха. Они ограниченно пригодны для создания асептической среды, в которой ведется работа со стерильными продуктами, и для защиты оператора при работе с порошкообразными веществами.

Защитные боксы следует использовать для всех видов работ с патогенными микроорганизмами и зараженными порошкообразными веществами, если установлено действующими на территории Республики Беларусь санитарными правилами.

Использование газовой горелки или прокаливателя проволоки в защитных боксах не рекомендуется. Если такая необходимость существует, газовая горелка должна иметь малый размер пламени, чтобы не создавать возмущений потока воздуха. Приемлемой альтернативой является применение одноразовых инструментов (петель, пипеток и т. д.).

5.2.2 Эксплуатация

В боксах должно находиться как можно меньше оборудования.

Там, где это практически оправдано, все необходимые предметы должны быть помещены внутрь бокса до начала работы, чтобы снизить количество перемещений рук в рабочем окне в прямом и обратном направлении. Оборудование и материалы должны располагаться так, чтобы уменьшить возмущения воздушного потока в рабочем окне.

Операторы должны быть соответствующим образом подготовлены для правильного использования боксов, чтобы обеспечить как их безопасность, так и сохранность продукта или культуры.

5.2.3 Чистка и дезинфекция

После использования рабочая область должна очищаться и дезинфицироваться при помощи соответствующего некоррозионного дезинфицирующего средства в соответствии с указаниями изготовителя. Следует регулярно проверять проволочные решетки, защитные предфильтры и начисто вытирать их тряпкой, пропитанной дезинфицирующим средством.

В боксах с ламинарным потоком лицевую сторону фильтра следует регулярно подвергать вакуумной чистке, осторожно, чтобы не повредить фильтрующий материал.

Защитные боксы должны проходить фумигацию перед заменой или обслуживанием фильтра.

По окончании очистки боксов для дезинфекции должны применяться УФ-лампы. Такие лампы следует регулярно чистить и заменять в соответствии с указаниями изготовителя.

5.2.4 Обслуживание и контроль

Используемые защитные боксы должны соответствовать их назначению, а также условиям среды в лаборатории.

Эффективность использования защитного бокса должна проверяться квалифицированным специалистом на момент ввода в эксплуатацию и позднее с регулярными интервалами в соответствии с указаниями изготовителя, а также после каждого ремонта или внесения конструктивных изменений.

Периодический контроль отсутствия каких-либо микробиологических загрязнений должен осуществляться путем проверки рабочей поверхности и стенок бокса.

Периодический контроль воздуха рабочей зоны на наличие аэробных микроорганизмов должен осуществляться в процессе работы фильтров с применением обычно используемого оборудования. Например, несколько открытых чашек Петри с неселективной агаровой средой (ею может быть PCA) оставляют в каждом боксе на срок 30 мин. Могут быть использованы и другие методы.

5.3 Весы и гравиметрические разбавители

5.3.1 Эксплуатация и неопределенность измерения

Весы обычно используют для взвешивания навесок анализируемой пробы, а также компонентов питательной среды и реактивов. Кроме того, они могут быть использованы для измерений путем взвешивания объемов жидкостей, применяемых для разведений.

Гравиметрические разбавители представляют собой электронные приборы, состоящие из весов и программируемого жидкостного дозатора, и применяются в ходе приготовления первичных растворов пробы; их функция заключается в добавлении растворителя к части пробы в заданной пропорции. Часть пробы взвешивается с установленным допуском и дозатор добавляет достаточное количество растворителя в нужной пропорции (например, 9 : 1 для десятикратного разведения).

Лаборатория пищевой микробиологии должна быть оснащена весами с соответствующим диапазоном и неопределенностью измерения для различных видов пищевой продукции, которые предполагается взвешивать.

Если не указано иное, максимально допускаемая погрешность измерения при взвешивании пробы для испытаний должна составлять не более 1 %.

Оборудование размещают на устойчивой горизонтальной поверхности, расположенной соответствующим образом, чтобы гарантировать его равновесие и защиту от сквозняков и вибраций.

5.3.2 Чистка и дезинфекция

После использования или после рассыпания (разбрызгивания) пробы при взвешивании оборудование должно очищаться и дезинфицироваться при помощи соответствующего некоррозионного дезинфицирующего средства.

5.3.3 Проверка рабочих характеристик и калибровка

Рабочие характеристики взвешивающей системы в процессе эксплуатации и после очистки должны регулярно проверяться при помощи контрольных грузов подготовленным для этого лицом. Точность калибровки должна контролироваться квалифицированным специалистом по всему диапазону измерений с периодичностью, зависящей от частоты использования оборудования.

Значения контрольных грузов также могут быть проверены непосредственно после калибровки весов.

5.4 Гомогенизаторы и смесители

5.4.1 Описание прибора

Прибор используют для приготовления исходной суспензии из испытуемой пробы нежидких продуктов.

Могут применяться следующие приборы:

– смеситель перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (типа Стомахер), может быть оснащен таймером и регулировкой скорости;

– ротационный гомогенизатор (смеситель) с условной скоростью вращения 8 000 – 45 000 об/мин, со стеклянными или металлическими резервуарами, снабженными крышками и выдерживающими условия стерилизации;

– вибрационный смеситель (типа Пульсифайер) со стерильными пластиковыми пакетами;

– гомогенизатор иной конструкции с соответствующей производительностью.

В особых случаях гомогенизацию можно проводить вручную с помощью стерильных стеклянных шариков, имеющих соответствующий диаметр (приблизительно 6 мм; см. ISO 6887-2 – ISO 6887-4 и ISO 8261).

5.4.2 Использование прибора

Время обработки пробы на перистальтическом гомогенизаторе обычно составляет от одной до трех минут (см. ISO 6887-2 – ISO 6887-4 и ISO 8261 для отдельных видов пищевой продукции).

Этот тип гомогенизатора не используют для следующих пищевых продуктов:

– продукты, способные прокалывать пакет (в связи с наличием острых, твердых или сухих частиц);

– продукты, которые трудно гомогенизировать из-за их структуры (например, колбасы типа салями).

Продолжительность работы ротационного гомогенизатора должна подбираться таким образом, чтобы общее количество оборотов ротора в минуту составляло от 15 000 до 20 000 включительно. Однако даже в случае гомогенизаторов с низкой скоростью вращения ротора время обработки не должно превышать 2,5 мин.

Вибрационный смеситель может применяться практически для всех видов пищевой продукции, включая твердые и сухие продукты. Время обработки обычно составляет от 0,5 до 1 мин. Если предполагается наличие микроорганизмов глубоко внутри когезивных структур, материал пробы следует измельчить перед его обработкой.

Метод приготовления суспензии путем встряхивания пробы со стеклянными шариками может быть использован в случае некоторых вязких или густых продуктов, в частности молочных продуктов (см. соответствующие стандарты).

5.4.3 Чистка и дезинфекция

Перистальтические гомогенизаторы и вибрационные смесители следует очищать регулярно, а также всякий раз после рассыпания, разбрызгивания или вытекания пробы из пакета. Стеклянные или металлические резервуары ротационных гомогенизаторов очищают и стерилизуют после каждого использования.

5.4.4 Обслуживание

Обслуживание и контроль приборов для гомогенизации проводят в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.5 pH-метр

5.5.1 Описание прибора

pH-метр используют для измерения при определенной температуре разности потенциалов между измеряющим электродом и электродом сравнения, погруженными в продукт. Точность измерения должна составлять ±0,05 pH, порог чувствительности – 0,01 pH. Прибор должен быть снабжен ручным или автоматическим компенсатором температуры.

Примечание – Измеряющий электрод и электрод сравнения часто размещают в одном комбинированном электроде.

5.5.2 Использование прибора

pH-метр используют для измерения значения pH питательных сред и реактивов с целью возможной коррекции в процессе приготовления, а также контроля качества после стерилизации. Он также может быть использован для измерения значения pH пробы и ее суспензии. Порядок работы с pH-метром описан в стандартах на конкретный вид анализируемой продукции, которые предусматривают условия определения значения pH и его коррекции.

pH-метр настраивают в соответствии с инструкциями изготовителя для измерения pH при стандартизованном значении температуры, например 25 °C. Значение pH считывают по достижении показаниями прибора стабильного состояния. Результат фиксируют с точностью до второго знака после запятой.

Примечание – Показание прибора может быть признано стабильным, если значения pH, измеренные с интервалом 5 с, отличаются друг от друга не более чем на 0,02 pH. При хорошем состоянии используемых электродов равновесие, как правило, достигается спустя 30 с.

5.5.3 Поверка и градуировка

Рабочие характеристики pH-метра поверяют в соответствии с инструкциями изготовителя, используя не менее двух, предпочтительно трех, стандартных буферных растворов как минимум ежедневно перед его применением. Определяют значения максимально допустимых погрешностей для данной поверки в зависимости от условий использования.

Значения pH стандартных растворов должны быть известны с точностью до второго знака после запятой при заданной температуре измерений (обычно pH 7,0 и 4,0 и/или pH 9,0 при 25 °C в соответствии с инструкциями изготовителя). Измеряемое значение pH должно находиться между значениями pH стандартных растворов.

После поверки рабочих характеристик pH-метра при помощи двух стандартных буферных растворов, pH-метр дополнительно поверяют путем использования третьего буферного раствора, так называемого контрольного, например, со значением pH 5 или pH 8.

pH-метр градуируют, если результаты поверки выходят за пределы максимально допускаемых погрешностей, в соответствии с инструкциями изготовителя.

Такая градуировка может предшествовать калибровке, позволяющей оценить неопределенность измерения pH-метра.

5.5.4 Обслуживание

Электроды эксплуатируют в соответствии с инструкциями изготовителя. В частности, регулярно проверяют:

– состояние электродов с учетом их старения и загрязнения;

– время отклика и устойчивость показаний.

После каждого использования электроды промывают дистиллированной или деионизированной водой. Принимая во внимание загрязнение и старение электродов, периодически проводят их более тщательную очистку в соответствии с инструкциями изготовителя.

Хранение электродов осуществляют в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.6 Автоклав

5.6.1 Описание

Автоклав обеспечивает достижение в его камере определенной температуры насыщенного пара и служит для уничтожения микроорганизмов.

Автоклав должен быть оборудован:

– по крайней мере одним предохранительным клапаном;

– сливным краном;

– регулирующим устройством, обеспечивающим поддержание в камере температуры с погрешностью не более ±3 °C относительно заданного значения (с учетом неопределенности измерения, которая связана с измерительной термопарой);

– термочувствительным элементом или регистрирующей измерительной термопарой.

Он также должен быть снабжен таймером и термографом.

5.6.2 Использование

При стерилизации паром перед подъемом давления весь воздух должен быть вытеснен. Если автоклав не оснащен устройством для автоматической откачки воздуха, воздух необходимо вытеснять до появления непрерывной струи пара.

Для уничтожения микроорганизмов значение температуры насыщенного пара внутри камеры должно составлять не менее 121 °C.

В пределах одного и того же цикла стерилизации автоклав не должен использоваться одновременно для стерилизации чистого оборудования (и/или питательных сред) и обеззараживания использованного оборудования (и/или питательных сред).

Предпочтительно использовать для обоих процессов отдельные автоклавы. По окончании автоклавной обработки всем материалам и оборудованию перед тем, как извлечь их, позволяют остыть внутри автоклава.

В целях безопасности содержимое автоклава не удаляют до тех пор, пока температура в нем не опустится ниже приблизительно 80 °C.

5.6.3 Обслуживание

Камеру автоклава регулярно очищают, осушают фильтры и уплотнители дверцы. Контролируют целостность уплотнителей дверцы. Операции по удалению влаги и накипи повторяют при необходимости с регулярными интервалами. При уходе за автоклавом следуют рекомендациям изготовителя.

5.6.4 Контроль и калибровка

Автоклав поддерживают в надлежащем рабочем состоянии; его регулярный контроль должен осуществляться компетентным квалифицированным персоналом в соответствии с инструкциями изготовителя.

Контрольные приборы сохраняют в надлежащем рабочем состоянии и регулярно поверяют их.

Первичная валидация должна включать в себя исследование рабочих характеристик для каждого вида рабочего цикла и каждой конфигурации загружаемых материалов и оборудования, применяемых на практике. Этот процесс необходимо повторять каждый раз после выполнения существенного ремонта или внесения изменений в конструкцию. Достаточное количество датчиков температуры должно располагаться внутри загружаемого объема материалов и оборудования, чтобы подтвердить надлежащее распределение тепла во всех его частях. При первичной и повторной валидации необходимо учитывать соответствие значений времени нагрева и охлаждения, а также значения температуры стерилизации.

Для каждого загружаемого объема материалов и оборудования как минимум один индикатор процесса должен быть размещен в его центре с целью контроля процесса нагрева, если прослеживаемые записи об эффективности данного процесса отсутствуют.

5.7 Средоварка

5.7.1 Описание

Средоварка предназначена главным образом для стерилизации больших объемов питательной среды (> 1 л). Она состоит из нагревательного резервуара, водяной рубашки и мешалки непрерывного действия. Средоварка должна быть оборудована средствами измерения температуры, давления, таймером и предохранительным клапаном.

Кроме этого, устройство должно иметь защитный фиксатор, чтобы предотвратить открывание крышки до того, как температура опустится ниже 80 °С.

5.7.2 Использование

Во всех случаях должны соблюдаться инструкции изготовителя.

Весь процесс приготовления среды протекает внутри прибора. После добавления всех необходимых ингредиентов они растворяются путем перемешивания и нагревания. Затем следует стерилизация.

5.7.3 Обслуживание

Средоварку моют и тщательно прополаскивают дистиллированной водой каждый раз между загрузками партии среды.

5.7.4 Контроль

Средоварка должна сохраняться в надлежащем рабочем состоянии и контролироваться регулярно компетентным квалифицированным персоналом в соответствии с инструкциями изготовителя.

Контрольные приборы сохраняют в надлежащем рабочем состоянии и регулярно проверяют их рабочие характеристики.

Первичная валидация должна включать в себя исследование рабочих характеристик для каждого вида рабочего цикла и каждого объема загрузки, применяемых на практике. Этот процесс повторяют после каждого существенного ремонта или модификации. Для подтверждения равномерного нагрева могут использоваться два термочувствительных элемента: один, расположенный рядом с контрольным, и другой – удаленный от него.

Должны проверяться значение температуры и продолжительность каждого цикла.

5.8 Термостат

5.8.1 Описание

Термостат состоит из изолированной камеры, обеспечивающей поддержание стабильной температуры и равномерное ее распределение в пределах значения максимально допускаемой погрешности, которая установлена в соответствии с методом испытаний.

5.8.2 Использование

Термостат должен быть снабжен системой регулировки, обеспечивающей поддержание температуры или прочих параметров на одинаковом стабильном уровне равномерно по всему его рабочему объему. Определяют рабочий объем, чтобы убедиться в достижении такого состояния.

Если значение температуры окружающего воздуха приближается к значению температуры в термостате или превышает его, камеру необходимо оборудовать охлаждающей системой.

Стенки термостата должны быть защищены от воздействия солнечного света.

По возможности термостат не следует загружать полностью за один прием, поскольку это приведет к увеличению времени установления температурного равновесия в питательной среде независимо от используемого типа термостата (с принудительной воздушной вентиляцией или без нее). Дверца термостата не должна оставаться открытой в течение длительного времени.

При загрузке термостата следует обращать внимание на условия циркуляции воздуха (см. 10.2.4).

5.8.3 Чистка и дезинфекция

Внутренние и наружные стенки термостата регулярно очищают и дезинфицируют, а также, если это требование применимо, удаляют пыль из системы вентиляции.

5.8.4 Контроль

Стабильность температуры и равномерность распределения тепла внутри рабочего объема термостата при рабочем значении (значениях) температуры контролируют путем одновременного использования нескольких термометров или термопар с известной погрешностью и соответствующим диапазоном измерений.

Данную информацию используют для определения приемлемого рабочего диапазона термостата и оптимального местоположения термометра, который служит для контроля рабочих температур.

Например, с целью получения заданного значения температуры (37 ± 1) °С, если по имеющимся данным диапазон температур в разных частях термостата составляет от 36,8 °С до 37,3 °С, рабочий диапазон должен быть уменьшен до значений от 36,2 °С до 37,7 °С, чтобы гарантировать, что во всех частях термостата будет достигнуто заданное значение температуры 37 °С.

Этот процесс следует повторять после каждого существенного ремонта или изменения конструкции.

Рабочая температура должна проверяться при помощи одного или нескольких максимальных и минимальных термометров или регистрирующих термопар.

Термометр или регистрирующие термопары, используемые для повседневного контроля работы термостата, должны быть размещены в такой позиции, в которой, как следует из имеющихся данных, достигается заданная температура.

Температуру в термостатах проверяют не реже чем каждый рабочий день. Для этого каждый термостат должен включать в себя как минимум одно рабочее измерительное устройство, шарик которого помещен в глицерин (или другой подходящий теплопроводный материал), содержащийся в закрытом сосуде.

Могут использоваться другие контрольные системы с аналогичными характеристиками.

5.9 Холодильник, холодильная камера

5.9.1 Описание

Камеры обеспечивают хранение при низких температурах. При консервации исследуемых проб пищевой продукции температура должна составлять (3 ± 2) °С (максимально допускаемая погрешность), за исключением отдельных случаев. Для прочих целей температура, если не указано иное, должна составлять (5 ± 3) °С.

5.9.2 Использование

Во избежание перекрестного заражения отдельные камеры или отдельные емкости используют, чтобы физически изолировать друг от друга при хранении следующие материалы:

– стерильные питательные среды и реактивы;

– пробы для испытаний;

– культуры микроорганизмов и засеянные среды.

Холодильники, охладители и холодильные камеры необходимо загружать таким образом, чтобы обеспечить необходимую циркуляцию воздуха и свести к минимуму вероятность перекрестного заражения.

5.9.3 Контроль

Температуру в каждой камере проверяют каждый рабочий день при помощи термометра или постоянно установленного термочувствительного элемента. Точность измерений устройства контроля температуры зависит от целей, для которых используется оборудование.

5.9.4 Обслуживание и чистка

Чтобы гарантировать надлежащее функционирование оборудования, за ним через регулярные промежутки времени осуществляют уход:

– удаляют пыль с крыльчатки двигателя или внешних пластин теплообменника;

– размораживают;
– проводят чистку и санитарную обработку внутренней части камер.

5.10 Морозильная камера и камера глубокой заморозки

5.10.1 Описание

Морозильная камера должна гарантированно обеспечивать хранение в замороженном состоянии. Значение температуры, если не указано иное, должно быть ниже минус 15 °С, для проб пищевой продукции, предпочтительно, ниже минус 18 °С.

Камера глубокой заморозки должна гарантированно обеспечивать хранение в замороженном состоянии. Значение температуры, если не указано иное, должно быть ниже минус 70 °С.

5.10.2 Использование

5.10.2.1 Морозильная камера

Должны иметься отдельные морозильные камеры или отдельные емкости для хранения:
– стерильных реактивов;
– проб для исследований;
– культур микроорганизмов.

Морозильная камера должна загружаться таким образом, чтобы поддерживалась достаточно низкая температура, в особенности если в нее помещают незамороженные продукты.

5.10.2.2 Камера глубокой заморозки

Принципиальное назначение камеры состоит в хранении микроорганизмов, эталонных и/или рабочих культур и реактивов.

Камера глубокой заморозки должна загружаться таким образом, чтобы поддерживалась достаточно низкая температура и не допускалось перекрестное заражение микроорганизмов и реактивов.

5.10.3 Контроль

Температуру в каждой камере проверяют регулярно, используя подходящее для этой цели устройство контроля температуры.

5.10.4 Обслуживание

За оборудованием осуществляют следующий регулярный уход:
– удаляют пыль с крыльчатки двигателя или внешних пластин теплообменника (если к ним имеется доступ);
– размораживают;
– проводят чистку и санитарную обработку внутренней части камер.

5.11 Баня с терморегулятором

5.11.1 Описание

Баня с терморегулятором, наполненная жидкостью (водой, этиленгликолем и т. п.), с подогнанной крышкой или без нее или иным приспособлением, которое ограничивает испарение, служит для поддержания заданного значения температуры. Зачастую температура может контролироваться более точно, чем в воздушном термостате, при этом максимально допускаемые погрешности составляют ±0,5 °С или менее. Рабочие значения температуры и необходимые значения максимально допускаемых погрешностей оговариваются отдельно для каждого способа применения или метода. Система охлаждения требуется для того, чтобы поддерживать температуру на уровне, равном или меньшем, чем уровень температуры окружающего воздуха.

5.11.2 Использование

Баню с терморегулятором в основном используют для следующих целей:
– инкубирования засеянных питательных сред при постоянной температуре;
– сохранения стерильной расплавленной агаровой среды при подготовке питательных сред;
– темперирования стерильной расплавленной агаровой среды для использования в соответствии с конкретными методами;
– приготовления исходных суспензий или растворов пробы в условиях контролируемой температуры;
– тепловой обработки исходных суспензий или растворов пробы в условиях контролируемой температуры (например, пастеризации).

Для точного контроля температуры баня должна быть оснащена циркуляционным водяным насосом и системой автоматического терморегулирования. Перемешивание воды не должно сопровождаться разбрызгиванием капель.

В случаях, когда необходимо обеспечить высокую точность или высокое значение температуры, следует использовать баню с крышкой. Должны применяться крышки с наклонной поверхностью, которые обеспечивают стекание конденсата влаги.

Для инкубирования засеянных сред поддерживают такой уровень жидкости, чтобы в процессе инкубирования поверхность испытательной среды всегда была расположена как минимум на 2 см ниже уровня жидкости в бане.

Прочие погружения должны быть расположены внутри бани таким образом, чтобы уровень их содержимого был ниже уровня жидкости.

Глубина воды должна быть такой, чтобы не допускать проникновения воды через крышку.

Могут потребоваться приспособления, которые обеспечивали бы устойчивость емкостей, например специальные подставки. С поверхности емкостей после извлечения из бани и перед дальнейшим использованием необходимо удалить влагу.

5.11.3 Контроль

Стабильность и равномерность распределения температуры внутри бани проверяют перед первым использованием и после каждого ремонта или внесения изменений в конструкцию, если они могут оказать влияние на контроль температуры.

Каждую баню контролируют при помощи термометра, термопары или устройства регистрации температуры с соответствующим минимальным значением неопределенности измерений (см. 5.28.2), независимых от системы автоматического терморегулирования.

Также может быть использовано устройство с цифровой индикацией, при условии, что его точность и дискретность были проверены.

Температуру бани контролируют в течение всего времени использования ежедневно для продолжительных периодов инкубирования.

5.11.4 Обслуживание

Баню наполняют жидкостью в соответствии с рекомендациями изготовителя. Для целей инкубирования культур предпочтительно использовать дистиллированную или деионизированную воду.

Уровень жидкости регулярно проверяют, чтобы убедиться в надлежащем функционировании бани и достаточной глубине погружения находящихся в ней предметов. Жидкость всегда должна покрывать нагревательные элементы.

Баню следует регулярно опорожнять, очищать, дезинфицировать и наполнять заново с периодичностью, которая зависит от условий применения, либо каждый раз при рассыпании и разбрызгивании материалов.

5.12 Пропариватели, в том числе водяные бани

5.12.1 Описание

Пропариватели и водяные бани имеют в своем составе нагревательный элемент, окруженный водой, в емкости с плотно закрывающейся крышкой. В пропаривателе образуется пар при обычном атмосферном давлении, в водяной бане вода нагревается до точки кипения или близкого к ней значения, с образованием пара или без него.

5.12.2 Использование

Пропариватели, включая водяные бани, используют для следующих целей:

– расплавления агаровой среды;

– приготовления термолабильных сред;

– частичного обеззараживания мелких предметов оборудования перед их использованием.

В емкости должен поддерживаться соответствующий безопасный уровень воды, для того чтобы нагревательные элементы все время оставались покрытыми водой.

Также может использоваться автоклав с функцией свободного парообразования.

5.12.3 Обслуживание

Пропариватели и водяные бани сохраняют в чистоте.

В случае необходимости следует проводить регулярное удаление накипи, с периодичностью, которая зависит от жесткости воды в регионе.

5.13 Стерилизационный шкаф

5.13.1 Описание

Стерилизационный шкаф представляет собой камеру, которая должна обеспечивать поддержание температуры от 160 °С до 180 °С для уничтожения микроорганизмов при помощи сухого тепла.

5.13.2 Использование

В стерилизационном шкафу стерилизуют только прочное стеклянное и металлическое оборудование; в него не следует помещать предметы, изготовленные из пластика или резины.

Перед обработкой в стерилизационном шкафу все стеклянное и металлическое оборудование предварительно очищают.

Если в стерилизационном шкафу обрабатывают мерную стеклянную посуду, точность указанных на ней значений объема подлежит регулярной проверке.

Распределение температуры в стерилизационном шкафу должно быть равномерным. Шкаф должен быть оборудован термостатом и термометром или устройством регистрации температуры с соответствующим значением погрешности.

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

После того как было достигнуто рабочее значение температуры, стерилизацию необходимо проводить в течение 1 ч при 170 °С либо следует выбрать иное эквивалентное соотношение температуры и времени.

По окончании стерилизации, во избежание растрескивания стеклянных предметов, перед тем, как извлечь их, дают им остыть внутри стерилизационного шкафа.

5.13.3 Контроль

Стабильность и равномерность температуры внутри стерилизационного шкафа проверяют перед первым использованием и после каждого ремонта или внесения изменений в конструкцию, которые могут оказать влияние на контроль температуры.

Шкаф должен быть оснащен калиброванным термометром, термопарой или иным устройством регистрации температуры с соответствующим значением погрешности, независимым от системы автоматической регулировки температуры. Контрольное устройство должно иметь разрешение 1 °С или меньшее при используемом значении температуры стерилизационного шкафа.

Температура в стерилизационном шкафу должна контролироваться и регистрироваться при каждом использовании.

5.13.4 Обслуживание

При необходимости внутренние поверхности шкафа подвергают очистке.

5.14 Микроволновая печь

5.14.1 Описание

Микроволновая печь – это устройство, обеспечивающее нагрев продукции с помощью микроволнового излучения при обычном атмосферном давлении.

5.14.2 Использование

Имеющиеся на сегодняшний день микроволновые печи используют только для подогрева жидкостей или расплавления агаровых питательных сред.

ВНИМАНИЕ: Не следует нагревать в микроволновой печи среды, которые содержат восприимчивые к теплу компоненты, если не было установлено, что такой способ нагревания не оказывает влияние на рабочие характеристики среды. В настоящее время оценка эффективности использования микроволновых печей для стерилизации питательных сред отсутствует, так что микроволновые печи не должны применяться для этой цели.

Микроволновая печь должна обеспечивать контролируемое нагревание жидкостей и питательных сред в цикле облучения волнами сверхвысокой частоты (СВЧ). Распространение волн СВЧ должно быть равномерным, чтобы не допускать появления зон перегрева. Печи, оборудованные вращающимся поддоном или рассеивателем микроволн, демонстрируют более равномерное распределение тепла.

Не следует использовать металлическое оборудование, в том числе металлические крышки. Колпачки и пробки бутылей ослабляют перед нагреванием.

Нагревание в течение более длительного времени с меньшим установленным уровнем мощности может обеспечивать лучшее распределение тепла.

ВНИМАНИЕ: Нагретые в печи предметы требуют осторожного обращения. В случае перегрева их содержимое может вытечь, а бутыли могут взорваться.

При расплавлении агаровой среды рекомендуется использовать низкие настройки мощности (например, цикл разморозки) и водяной теплообменник (например, от 50 до 100 мл воды в лабораторном стакане, пригодном для обработки в микроволновой печи) для дополнительного контроля над процессом нагревания.

Рекомендуется выждать не менее 5 мин после окончания процесса нагрева и перед извлечением материалов из микроволновой печи.

5.14.3 Контроль

В начале эксплуатации микроволновой печи должна быть определена соответствующая продолжительность нагревания и настройки мощности для различных объемов жидкостей и питательных сред, которые используются в обычной практике, чтобы обеспечить оптимальную производительность и избежать перегрева чувствительных к теплу продуктов.

5.14.4 Обслуживание

Микроволновую печь очищают немедленно после разбрызгивания или рассыпания материалов, а также через регулярные промежутки времени в зависимости от условий использования.

Целостность уплотнителей дверцы печи и отсутствие утечки излучения должны регулярно проверяться.

5.15 Машина для мойки стеклянной посуды

5.15.1 Описание

Лабораторные моечные машины оборудованы электронным управлением и служат для мойки лабораторной стеклянной посуды общего назначения; они могут быть запрограммированы на выполнение разнообразных циклов мойки и полоскания (например, с использованием дистиллированной или деионизированной воды либо кислоты).

Приспособления для мойки стеклянных пипеток представляют собой специальные моечные устройства, предназначенные для очистки узких каналов пипеток.

5.15.2 Использование

Существует большое количество типов оборудования для мойки стеклянной посуды, и все оборудование должно устанавливаться и эксплуатироваться в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.15.3 Контроль

Эффективность очистки контролируют путем внешнего осмотра, а в критических случаях проводят испытания, чтобы убедиться в отсутствии на стеклянной посуде ингибирующих веществ.

Проверка на наличие остатков щелочей и кислот может выполняться при помощи индикаторного раствора с индикатором pH; значение pH должно находиться в диапазоне от 6,5 до 7,3.

5.15.4 Обслуживание

Регулярное техническое обслуживание с достаточной периодичностью планируют и осуществляют в соответствии с указаниями изготовителя.

Более частый уход может быть необходим в случаях, когда оборудование интенсивно используется, или в регионах с жесткой водой.

5.16 Оптический микроскоп

5.16.1 Описание

Микроскопы подразделяются на несколько типов: монокулярные, бинокулярные, с устройством визуального отображения, камерой или флуоресцентным оборудованием и т. п., а также с внешним или внутренним источником света. При бактериологических исследованиях применяются объективы с коэффициентом увеличения от ×10 (с сухими линзами) до приблизительно ×100 (с масляной иммерсией и подпружиненной револьверной головкой) для достижения общего увеличения от ×100 до ×1 000. Средства фазово-контрастной микроскопии также имеют большое значение при исследовании препаратов, приготовленных по методу «раздавленная капля».

5.16.2 Использование

Оптику микроскопа настраивают в соответствии с инструкциями изготовителя. Оптическая ось луча света от электрической лампы с высокой интенсивностью излучения должна проходить через центр конденсера микроскопа, предметное стекло с препаратом и объектив, достигая окуляра, таким образом, чтобы не допустить появления сферических и хроматических аберраций.

5.16.3 Обслуживание

При хранении, чистке и техническом обслуживании следуют инструкциям изготовителя. В условиях повышенной влажности не допускают образования конденсата, поскольку это может привести к ухудшению характеристик линз.

Ежедневно или каждый раз после использования иммерсионные линзы и связанные с ними части очищают от масла при помощи специальной ткани. Применяют растворитель, рекомендованный изготовителем. Регулярно удаляют жировые загрязнения, оставленные ресницами, с линз окуляров.

Оптические системы легко подвержены повреждениям, в этой связи показано их техническое обслуживание, желательно осуществляемое изготовителем.

5.17 Газовая горелка или прокаливатель проволоки

5.17.1 Описание

Газовые горелки (горелки Бунзена) производят узкую струю открытого пламени от сгорания природного или сжиженного газа. Путем изменения количества воздуха, подмешиваемого к газу, регулируется получаемая при этом температура.

Прокаливатели проволоки используют электрическую энергию для накаливания до красного цвета без образования пламени в процессе стерилизации петель и игл, используемых для работы с культурами.

5.17.2 Использование

Газовые горелки используют главным образом для стерилизации металлических петель или игл путем доведения их до красного каления, а также для стерилизации пламенем прочих мелких предметов и оборудования, устойчивых к высоким температурам.

Прокаливатели проволоки служат для стерилизации металлических петель и игл и предпочтительным образом используются при работе с патогенными бактериями, так как позволяют предотвратить образование брызг и избежать риска перекрестного заражения.

Газовые горелки могут производить большое количество тепла, что приводит к завихрениям потока воздуха в лаборатории.

Асептические условия могут быть достигнуты без использования газовой горелки за счет использования однократно применяемых материалов.

В защитных боксах следует избегать использования газовых горелок, поскольку они могут создавать нежелательные помехи для ламинарного потока воздуха. В этом случае рекомендуется применять одноразовое стерильное оборудование.

5.17.3 Обслуживание

Газовые горелки и крышки прокаливателей проволоки регулярно очищают, в первую очередь в случае разбрызгивания микробиологической культуры на поверхность этих устройств.

5.18 Дозатор питательных сред и реактивов

5.18.1 Описание

Дозатор представляет собой инструмент или устройство, служащие для дозирования питательной среды и реактивов в пробирки, флаконы или чашки Петри. Конструкция таких приспособлений варьируется от простейших измерительных цилиндров, пипеток и ручных шприцев, а также автоматических шприцев и перистальтических насосов до программируемых устройств с электронным управлением и различными механизмами автоматической подачи.

5.18.2 Использование

На поверхности чистого оборудования, используемого для дозирования питательной среды и реактивов, не должно быть остатков ингибирующих веществ. Для дозирования селективных питательных сред используют отдельный комплект трубок, чтобы снизить риск проникновения или переноса таких веществ.

Если требуется асептическое дозирование питательных сред или реактивов, все части дозирующего оборудования, контактирующие с продуктом, должны быть стерильными.

5.18.3 Контроль

Неопределенность измерений инструмента или прибора должна быть соответствующей для максимально допускаемой погрешности измерения дозируемого объема, которая обычно не должна превышать ±5 %. Максимально допускаемая погрешность измерений объема жидкого разбавителя, применяемого для приготовления десятикратных разведений, составляет ±2 %.

Дозируемые объемы проверяют перед первым использованием и далее регулярно в соответствии с документальным планом, а также каждый раз после выполнения настроек, влияющих на значение дозируемого объема.

5.18.4 Чистка и обслуживание

Наружную поверхность дозатора очищают после каждого применения. Тщательно обмывают и ополаскивают все части дозатора, которые контактировали с продуктом, и в случае необходимости стерилизуют их для использования со стерильными жидкостями. Дезинфицирующие средства не применяют для поверхностей, контактирующих с продуктом, поскольку они могут сообщать им ингибирующие свойства.

Все автоматические дозаторы должны сохраняться в надлежащем состоянии за счет регулярного обслуживания в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.19 Механический смеситель типа Вортекс

5.19.1 Описание

Этот аппарат способствует равномерному перемешиванию жидкой среды (например, десятикратных разведений и проб жидкостей для испытаний) или суспензий бактериальных клеток в жидкости.

Перемешивание достигается путем эксцентрического (вихревого) вращения содержимого пробирки или емкости.

5.19.2 Использование

Основание пробирки или емкости, содержащей жидкость, которая подлежит перемешиванию, прижимают к головке смесителя. Скорость перемешивания контролируют путем изменения скорости вращения двигателя или угла соприкосновения с головкой смесителя.

Оператор должен гарантировать отсутствие брызг в процессе перемешивания за счет соответствующей установки скорости и удерживания пробирки в положении примерно на одну треть ее длины ниже верхнего края, что позволяет лучше контролировать перемещение пробирки и тем самым избегать чрезмерного повышения содержащейся в ней жидкости.

Следует принимать необходимые меры для того, чтобы снизить образование аэрозолей при открывании емкостей, прошедших вихревую обработку.

5.19.3 Контроль

Качество перемешивания подтверждается образованием в ходе его выполнения вихря в глубине жидкости.

5.19.4 Обслуживание

Оборудование содержат в чистоте. При разбрызгивании жидкости оборудование обеззараживают с применением соответствующих лабораторных средств дезинфекции.

5.20 Прибор для подсчета колоний

5.20.1 Описание

Ручные приборы для подсчета колоний используют счетное устройство, которое приводится в действие изменением давления, и обычно обеспечивают подачу звукового сигнала при каждом обнаружении колонии, а также цифровой вывод общих результатов подсчета. Это могут быть несложные приспособления в виде ручки, либо они могут иметь освещенную площадку с калиброванной сеткой для пластинки и увеличительное стекло, чтобы облегчить процесс подсчета колоний. Автоматические электронные счетчики колоний, которые включают в себя средства анализа изображений, действуют благодаря сочетанию программных и аппаратных систем с применением камеры и монитора.

5.20.2 Использование

В процессе эксплуатации следуют инструкциям изготовителя. Настраивают чувствительность автоматического счетчика так, чтобы гарантировать подсчет всех целевых колоний. Автоматические электронные счетчики колоний также требуют дополнительного программирования при использовании разных типов агара и матриц, а также при подсчете на поверхности агара и в чашках Петри, чтобы обеспечить адекватное различение целевых колоний.

5.20.3 Контроль

Проверки должны выполняться вручную на регулярной основе, чтобы гарантировать точный подсчет с использованием счетчика колоний.

Кроме того, автоматические счетчики колоний, когда они используются, необходимо проверять ежедневно с помощью калибровочной пластинки, содержащей известное количество доступных для подсчета частиц или колоний.

5.20.4 Обслуживание

Оборудование содержат в чистоте и оберегают от пыли; не допускают появления царапин на поверхностях, которые представляют важность для процесса подсчета колоний. Планируют регулярное обслуживание электронных счетчиков, включающих средства анализа изображений, в соответствии с указаниями изготовителя и с приемлемой периодичностью.

5.21 Оборудование для культивирования в модифицированной атмосфере

5.21.1 Описание

Оборудование этого типа может представлять собой герметически закрываемый сосуд или любое другое соответствующее оборудование, способное поддерживать модифицированную атмосферу (например, для целей анаэробиоза) на всем протяжении инкубирования в питательной среде. Могут быть использованы другие устройства аналогичного действия, такие как анаэробные камеры.

При установке и эксплуатации следуют инструкциям изготовителя.

5.21.2 Использование

Необходимый состав атмосферы может быть получен путем добавления смеси газов (например, из газовых баллонов) после удаления воздуха из сосуда, путем вытеснения атмосферы из камеры или любыми другими соответствующими средствами (например, с использованием имеющихся в продаже готовых упаковок с газом).

В целом анаэробное инкубирование требует наличия атмосферы, в которой содержится менее 1 % кислорода и от 9 % до 13 % двуокиси углерода, а микроаэробное (капноэробное) инкубирование требует наличия атмосферы, в которой содержится от 5 % до 7 % кислорода и приблизительно 10 % двуокиси углерода.

Эти условия могут изменяться в зависимости от требований для конкретного типа микроорганизмов.

5.21.3 Контроль

Биологический или химический индикатор для контроля характера атмосферы помещают в каждую камеру при каждом использовании. Развитие контрольного штамма или изменение цвета химического индикатора свидетельствует о достижении соответствующих условий инкубирования.

5.21.4 Обслуживание

Если используется катализатор, его регулярно регенерируют в соответствии с инструкциями изготовителя. При наличии кранов и клапанов их очищают и смазывают, чтобы обеспечить надлежащее функционирование, а при необходимости заменяют.

Оборудование подлежит регулярной чистке и дезинфекции.

5.22 Центрифуга

5.22.1 Описание

Центрифуги являются устройствами с механическим или электронным управлением, в которых центробежная сила используется для отделения взвешенных частиц, в том числе микроорганизмов, от жидкостей.

5.22.2 Использование

Для некоторых задач необходимая концентрация целевых микроорганизмов достигается путем обработки в центрифуге жидких проб, которые затем могут быть ресуспендированы в жидкости и подвергнуты дальнейшему исследованию.

Принимают необходимые меры предосторожности, чтобы избежать образования аэрозоля и перекрестного заражения за счет соблюдения правил эксплуатации оборудования и использования стерильных центрифужных пробирок или емкостей.

5.22.3 Контроль

Если значение скорости центрифугирования является критическим для конкретной задачи или оно точно для нее определено, индикатор скорости и установки центрифуги должны проверяться с помощью отдельного калиброванного тахометра регулярно, а также каждый раз после существенного ремонта и внесения значительных изменений в конструкцию.

5.22.4 Обслуживание

Центрифуги очищают и дезинфицируют регулярно, а также после любого разбрызгивания в случае с микробными культурами или потенциально зараженными пробами.

Центрифуги подлежат регулярному техническому обслуживанию.

5.23 Нагревательная плитка и нагревательный кожух

5.23.1 Описание

Нагревательные плитки и кожухи представляют собой нагревательные устройства с термостатическим контролем. Некоторые нагревательные плитки и кожухи имеют в своем составе системы магнитного перемешивания.

5.23.2 Использование

Нагревательные плитки и кожухи, оснащенные системами магнитного перемешивания, используются для нагрева относительно больших количеств жидкости, таких как среды.

Нагревательные плитки и кожухи без систем перемешивания не следует использовать для подготовки сред.

5.23.3 Обслуживание

Все брызги удаляют сразу же после остывания устройства.

5.24 Автоматический аппарат для спирального посева

5.24.1 Описание

Автоматический аппарат для спирального посева – это дозатор, распределяющий заданное количество жидкости по поверхности вращающейся чашки Петри с агаризованной средой. Дозирующий манипулятор двигается от центра чашки к ее наружному краю по архимедовой спирали. Распределяемый объем уменьшается по мере удаления от центра к краю чашки таким образом, чтобы соблюдалась обратная зависимость между дозируемым объемом и значением радиуса спирали. Количество пробы, наносимое на каждый конкретный участок, является известным и постоянным. Для загрузки и дозирования жидкостей необходимо наличие вакуумного насоса.

5.24.2 Использование

Оборудование служит для распределения жидкой пробы, гомогенизированной пробы или раствора в чашке Петри с агаризованной средой с целью облегчить определение количества колоний. После инкубирования колонии развиваются вдоль линий, по которым была нанесена жидкость. Колонии в известной области подсчитывают с использованием счетной сетки, входящей в комплект оборудования, и вычисляют их количество.

Поверхность чашек Петри, используемых вместе с автоматическим аппаратом для спирального посева, должна быть ровной и не должна содержать пузырьки.

Чашки следует предварительно осушить, чтобы гарантировать отсутствие на них избыточной влаги.

Дозирующую систему следует дезинфицировать и прополаскивать стерильной водой перед каждым дозированием пробы, а также после каждого использования.

5.24.3 Контроль

Угол рабочей части пера контролируют ежедневно с использованием вакуума для удержания покровного стекла у лицевой его части. Покровное стекло должно располагаться параллельно и на расстоянии 1 мм относительно агаровой поверхности.

Траекторию дозирования проверяют путем распределения легкосмываемых чернил. Плотность спиральной траектории дозирующего устройства должна быть наибольшей в центре чашки, где начинается нанесение пробы, и должна постепенно уменьшаться до самого момента отрыва дозирующего пера. Незасеянная область чашки должна находиться в центре и составлять приблизительно 2,0 см в диаметре.

Проводятся ежедневные проверки, чтобы гарантировать, что рабочая часть пера располагается под нужным углом к агаровой поверхности. Для этого используют покровное стекло и уровнемер из комплекта прибора.

Стерильность аппарата для спирального посева должна контролироваться путем нанесения стерильной воды для каждой серии исследуемых проб.

Гравиметрическая проверка дозируемого объема пробы должна осуществляться регулярно с использованием дистиллированной воды. Полученное значение массы должно иметь максимально допускаемую погрешность ±5 % относительно ожидаемого значения массы для дозируемого количества жидкости.

5.24.4 Обслуживание

Дезинфекция трубок дозирующей системы и пера может осуществляться путем промывания их раствором, содержащим от 0,5 % до 1 % свободного хлора. За этим следует промывка стерильной дистиллированной или деионизированной водой.

Засорения каналов можно избежать, если позволить всем частицам в суспензии пробы осесть перед помещением ее в аппарат и использовать для посева только верхний слой жидкости.

Все брызги следует удалять немедленно, а оборудование очищать на регулярной основе. Техническое обслуживание и контроль оборудования осуществляют в соответствии с интенсивностью его использования.

5.25 Дистилляторы, деионизаторы и обратноосмотическое оборудование

5.25.1 Описание

Такие устройства служат для производства дистиллированной или деоинизированной (деминерализованной) воды требуемого качества (см. ISO/TS 11133) для приготовления микробиологических питательных сред или реактивов, а также для других лабораторных нужд.

5.25.2 Использование

Оборудование устанавливают, сдают в эксплуатацию и используют в соответствии с инструкциями изготовителя, с соответствующим учетом расположения систем подачи воды, электроэнергии и удаления мусора в лаборатории.

5.25.3 Контроль

Воду следует регулярно, а также после хранения проверять на достаточную проводимость, которая должна составлять не более 25 мкСм/см (соответствует сопротивлению $\geq$ 40 000 Ом·см), для приготовления сред и реактивов.

Если вода хранится до использования или производится на ионообменной установке, необходимо выполнять соответствующие проверки на отсутствие микробиологических загрязнений в соответствии с ISO/TS 11133.

5.25.4 Обслуживание

Периодичность чистки и удаления накипи для дистилляторов зависит от жесткости подаваемой в них воды. Деионизаторы и системы обратного осмоса должны обслуживаться в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.26 Таймеры и устройства отсчета времени

5.26.1 Описание

Таймеры и интегрированные устройства отсчета времени – это приборы, обеспечивающие правильное определение промежутков времени при проведении многих видов работ в лаборатории, для которых продолжительность выполнения заранее установлена и является критической.

5.26.2 Использование

Аналоговые и цифровые ручные и настольные таймеры, применяемые для контроля продолжительности лабораторных операций (например, обработки красителями микробиологических пленок, гомогенизации проб), должны находиться в надлежащем рабочем состоянии и обеспечивать требуемую точность.

Интегрированные таймеры на лабораторном оборудовании (например, автоклавах, центрифугах, гомогенизаторах) эксплуатируют в соответствии с инструкциями изготовителя. Эти таймеры должны обеспечивать требуемую точность.

5.26.3 Контроль

Все таймеры, используемые в лабораторной практике в случаях, когда продолжительность операций является критической для получаемого результата, проверяются при помощи национального сигнала точного времени регулярно, а также после каждого существенного ремонта.

5.26.4 Обслуживание

Для корректного функционирования таймеры нуждаются в регулярной чистке и проверке.

Интегрированные устройства отсчета времени должны подвергаться проверке в рамках общей процедуры обслуживания соответствующего оборудования.

5.27 Пипетки и пипетторы

5.27.1 Описание

Пипетки представляют собой стеклянные или одноразовые пластиковые устройства для переноса некоторых объемов жидкостей или вязких материалов; пипетки с градуировкой переносят измеренные объемы с точностью, которая зависит от их технических характеристик.

Автоматические (механические) пипетторы с пластиковыми наконечниками – это устройства, которые позволяют дозировать фиксированные или переменные объемы жидкостей за счет действия поршня с ручным или электрическим приводом.

5.27.2 Использование

Поврежденные или сломанные пипетки выбрасывают.

Стерильные пастеровские или градуированные пипетки и наконечники должны снабжаться непоглощающими ватными затычками, чтобы предотвратить заражение при работе с микробными культурами.

Жидкости в микробиологической лаборатории не следует набирать в пипетку ртом, за исключением незараженных жидкостей.

Груши, используемые на пастеровских или градуированных пипетках, и наконечники пипетторов должны быть такого размера, чтобы они не допускали утечек жидкости и обеспечивали эффективное функционирование.

5.27.3 Контроль

Градуированные пипетки проверяют, чтобы убедиться, что они позволяют дозировать нужные объемы, если их точность (правильность и прецизионность) не была подтверждена изготовителем.

Методика калибровки пипеток/пипетторов описана в ISO 835 (все части) и ISO 8655-1.

Новые пипетторы испытывают перед началом использования и через регулярные промежутки времени в зависимости от частоты и характера применения, чтобы убедиться в соблюдении значений максимально допускаемых погрешностей, установленных в ISO 8655-1. Выполняют промежуточные гравиметрические проверки с использованием дистиллированной или деионизированной воды, чтобы гарантировать, что погрешность дозируемого объема не выходит за пределы максимально допускаемых погрешностей.

Новые партии градуированных пипеток также подвергают проверке.

5.27.4 Обслуживание

Неодноразовые пипетки и автоматические пипетторы соответствующим образом обеззараживают и очищают (стерилизуют) после каждого использования.

Если цилиндры или поршни автоматических пипетторов загрязняются в процессе использования, их отсоединяют для обеззараживания и чистки. После повторной установки их калибруют заново. Если это не представляется возможным выполнить в лаборатории, пипетторы возвращают изготовителю для сборки и калибровки.

5.28 Термометры и устройства контроля температуры, включая автоматические регистраторы

5.28.1 Описание

Термометры являются устройствами, в стеклянной трубке которых заключены ртуть или спирт, и служат для контроля значений температуры в диапазоне, необходимом для деятельности лаборатории.

Прочие устройства контроля температуры имеют в своем составе платиновые термометры сопротивления и приборы, включающие термопары, для измерения температуры и обеспечивают визуальную, на твердом носителе, либо электронную фиксацию изменений значения температуры во времени.

Эталонные термометры и прочие устройства контроля температуры должны калиброваться по национальным или международным эталонам и обеспечиваться соответствующими сертификатами. Они используются исключительно как образцовые средства измерений и их не следует применять для целей повседневного контроля.

Рабочие термометры и прочие устройства регистрации температуры должны калиброваться таким образом, чтобы обеспечить прослеживаемость к национальным или международным стандартам.

Устройства, обеспечивающие необходимую точность, которые удовлетворяют соответствующим международным или национальным техническим требованиям, также могут использоваться в качестве рабочих термометров, после того как их рабочие характеристики были проверены.

5.28.2 Использование

Термометры и прочие устройства контроля температуры должны обеспечивать измерение температуры в соответствии с выполняемой задачей и в пределах установленных значений максимально допускаемых погрешностей.

Неопределенность измерения устройства контроля температуры должна быть в пять раз меньшей, чем диапазон требуемой максимально допускаемой погрешности. Например, для получения максимально допускаемой погрешности ±1 °С неопределенность измерения должна составлять ±0,25 °С; для получения максимально допускаемой погрешности ±0,5 °С неопределенность измерения должна составлять ±0,125 °С. Неопределенность измерения для калибровки эталонного термометра также должна учитываться при установлении значения рабочей температуры.

Термометры или термопары, которые размещаются в термостатах, должны находиться в специальных защитных контейнерах, наполненных глицерином, жидким парафином или пропиленгликолем, для предохранения от быстрой потери тепла при открывании двери и обеспечения стабильных показаний.

У термометров полного погружения при использовании погружают только шарик.

Термометры в водяных банях должны быть погружены в воду в соответствии с индивидуальными указаниями, например термометры частичного погружения должны погружаться на глубину, определенную для данного вида термометров, например 76 или 100 мм.

Термометры с нарушенным ртутным или спиртовым столбиком не используются.

Стеклянные ртутные термометры отличаются хрупкостью и, если существует риск, что они разобьются, их помещают в защитный корпус, не создающий помех измерениям температуры.

ВНИМАНИЕ! Ртуть опасна для здоровья. При разбрызгивании ее удаляют в соответствии с действующими национальными требованиями.

5.28.3 Проверка

Эталонные термометры должны калиброваться во всем их диапазоне по прослеживаемым национальным или международным эталонам перед первым использованием как минимум каждые 5 лет. Промежуточная одноточечная калибровка (например, по точке замерзания воды) проводится с целью контроля их технических характеристик.

Эталонные термопары должны быть полностью откалиброваны по прослеживаемым национальным или международным эталонам перед первым использованием и в соответствии с инструкциями изготовителя. Промежуточные проверки для контроля технических характеристик выполняются с использованием эталонного термометра.

Прочие устройства контроля температуры (такие как приемники теплового излучения) должны калиброваться по национальным или международным эталонам в соответствии с указаниями изготовителя.

Рабочие термометры и термопары должны проверяться по точке замерзания воды и/или по эталонному термометру в рабочем диапазоне температур.

5.28.4 Обслуживание

Термометры и термопары сохраняют в чистом и неповрежденном состоянии.

Прочие устройства контроля температуры хранят в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.29 Иммуномагнитный сепаратор

5.29.1 Описание

Данный вид оборудования используется для отделения и накопления целевых микроорганизмов в жидких культурах при помощи мелких парамагнитных шариков, покрытых соответствующими антителами.

Ручные сепараторы состоят из ротационного смесителя со скоростью вращения от 12 об/мин до 20 об/мин и концентратора частиц со съемной магнитной полоской.

Автоматические сепараторы функционируют за счет расположенных в виде гребенки рядов магнитных стержней и стоек для пробирок. Магнитные частицы перемещаются из пробирки в пробирку, что позволяет проводить всю процедуру сепарации, включая этапы промывки, в автоматическом режиме и в закрытой среде.

5.29.2 Использование и проверка

В процессе использования оборудования следуют инструкциям изготовителя и требованиям специализированных стандартов (например, для E. coli O157). В ручных системах проверяют скорость вращения смесителя.

В ручных и автоматических системах проверяют способность системы изолировать низкие уровни содержания микроорганизмов перед вводом ее в повседневную эксплуатацию.

Важно оценить потенциальную вероятность перекрестного заражения при выполнении процедур ручной сепарации и принять соответствующие меры во избежание его появления.

5.29.3 Обслуживание

Оборудование контролируют и обслуживают в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.30 Система фильтрации

Используемая система фильтрации должна соответствовать ISO 8199.

5.31 Прочее оборудование и программное обеспечение

Прочее оборудование и используемое с ним программное обеспечение должны обеспечивать достижение необходимой точности и должны соответствовать техническим требованиям в зависимости от проводимых испытаний. Программы калибровки должны быть определены для ключевых величин или значений, если эти параметры оказывают существенное влияние на результаты. Перед повседневным применением оборудование проверяют или калибруют, чтобы определить, соответствует ли оно требованиям лаборатории и соответствующим нормативным техническим требованиям. Любые модификации или изменения конфигурации программного обеспечения лабораторией должны проверяться, чтобы гарантировать, что модифицированное программное обеспечение выдает правильный результат.

6 Подготовка стеклянной посуды и прочих лабораторных материалов

6.1 Подготовка

Стеклянная посуда и прочие лабораторные материалы, применяемые для целей микробиологических исследований, должны иметь подходящую конструкцию, использоваться надлежащим образом и подготавливаться таким способом, чтобы их чистота и/или стерильность были гарантированы вплоть до момента использования.

Конструкция должна быть такой, чтобы исключить или ограничить контакт между оператором и инфекционным материалом.

Пробирки и флаконы должны соответствующим образом закупориваться. При необходимости изделия из стекла (например, пипетки), подлежащие стерилизации, помещают в специальные контейнеры или заворачивают в подходящий материал (специальную бумагу, алюминиевую фольгу и др.). Стеклянная посуда, которая подвергается автоклавной обработке в незаполненном виде, должна обеспечивать свободный доступ в нее пара, в противном случае стерилизация будет неэффективной.

6.2 Стерилизация (обеззараживание)

6.2.1 Общие требования

Температура и продолжительность стерилизации (обеззараживания) должны регистрироваться. Можно использовать индикаторы стерилизации для различения стерилизованных и нестерилизованных материалов.

6.2.2 Стерилизация сухим теплом

Стеклянную посуду и т. п. прогревают в стерилизационном шкафу в течение не менее 1 ч при температуре 170 °С или в эквивалентных условиях.

6.2.3 Стерилизация влажным теплом (паром)

Использование влажного пара под давлением – это наиболее эффективный метод стерилизации лабораторной стеклянной посуды и материалов. Температура в камере автоклава должна поддерживаться на уровне 121 °С в течение не менее 15 мин (см. 5.6).

6.2.4 Обеззараживание при помощи химических составов

Химические составы (например, хлорсодержащие продукты, спирты, соединения четвертичного аммония) используют в надлежащей концентрации и в течение соответствующего контактного времени.

Необходимо убедиться, что остатки химических веществ не оказывают влияния на выделение микроорганизмов.

6.3 Одноразовое оборудование и материалы

Одноразовое оборудование и материалы могут применяться таким же образом, как и повторно используемые оборудование и материалы (стеклянная посуда, чашки Петри, пипетки, флаконы, пробирки, петли, распылители и т. п.), если они имеют сходные технические характеристики.

Рекомендуется проверять, приспособлено ли данное оборудование для целей микробиологических исследований (в частности, что касается его стерильности) и не содержат ли материалы веществ, ингибирующих рост микроорганизмов (см. ISO 9998).

6.4 Хранение чистой стеклянной посуды и материалов

Чистую стеклянную посуду и материалы хранят в условиях, обеспечивающих сохранность их чистоты и защиту от пыли.

6.5 Содержание стерильной стеклянной посуды и материалов

Стеклянную посуду и оборудование хранят в условиях, которые обеспечивают сохранность их стерильности. Одноразовое оборудование хранят в соответствии с инструкциями изготовителя, не нарушая целостность упаковки. Оборудование, подготовленное в лаборатории, хранят в чистых условиях.

Если стерилизация оборудования проводится для целей микробиологических исследований, на каждую упаковку наносится информация о сроке годности (или дате изготовления).

6.6 Порядок обеззараживания и дезинфекции

6.6.1 Обеззараживание одноразового оборудования

Перед уничтожением одноразового оборудования его обеззараживают.

Помимо методов, приведенных в настоящем подразделе, может применяться сжигание. Если в помещениях лаборатории имеется прокаливатель, обеззараживание и уничтожение могут выполняться как одна операция.

6.6.2 Обеззараживание стеклянной посуды и материалов перед использованием

В большинстве случаев стерилизацию оборудования выполняют с применением влажного тепла (см. 6.2.3) или сухого тепла (см. 6.2.2).

В отдельных случаях (например, при отборе проб в полевых условиях) может быть целесообразным проводить обеззараживание химическими методами. После такой обработки оборудование не должно содержать ингибирующие вещества.

6.6.3 Обеззараживание стеклянной посуды и материалов после использования

Материалы, предназначенные для обеззараживания и уничтожения, должны помещаться в специальные контейнеры, например в пластиковые пакеты, пригодные для обработки в автоклаве. Автоклавная обработка – это наиболее предпочтительный метод для всех процессов обеззараживания (не менее 30 мин при 121 °С). Загрузку в автоклав осуществляют таким образом, чтобы способ-

ствовать проникновению тепла в глубину (например, удаляют внешнюю упаковку), и следят за тем, чтобы колпачки (крышки) были ослаблены, а пакеты открыты.

Могут быть использованы другие, альтернативные методы, если их применение допускается национальными положениями.

Автоклавная обработка всего оборудования, контактировавшего с микробиологическими культурами (твердой или жидкой питательной средой), включая многократно используемые контейнеры, выполняется перед его мойкой.

В процессе исследования обеззараживание коррозионно-устойчивого оборудования небольших размеров (например, пипеток) может проводиться путем погружения в свежеприготовленный рабочий раствор дезинфицирующего средства.

Пастеровские пипетки должны использоваться однократно.

Большинство дезинфицирующих средств (см. приложение А) обладают определенным токсическим действием. При работе с концентрированным дезинфицирующим средством следует надевать перчатки и защитные очки.

6.7 Утилизация отходов

Правильное уничтожение зараженных материалов не оказывает непосредственного влияния на качество исследования образцов, однако данный вопрос входит в компетенцию менеджмента лаборатории.

Утилизация отходов должна соответствовать национальным требованиям в области охраны окружающей среды, обращения с отходами, охраны труда и техники безопасности.

Систему, предусматривающую идентификацию и изоляцию зараженных материалов и их контейнеров, необходимо разработать для:

– незараженных отходов (например, образцов пищевой продукции, не содержащих культуры микроорганизмов), которые могут быть уничтожены вместе с обычными отходами;

– скальпелей, иголок, ножей, осколков стекла;

– зараженных материалов, подлежащих автоклавированию и переработке;

– зараженных материалов, подлежащих автоклавированию и уничтожению или только уничтожению, при условии, что эти материалы сжигаются (см. специальные требования по микроорганизмам, относящимся к 3-й категории риска).

Сжигание зараженных материалов и их контейнеров должно выполняться в соответствии с национальными требованиями по охране окружающей среды, охране труда и технике безопасности.

Материалы, зараженные микроорганизмами, которые относятся к 3-й категории риска, а также их контейнеры должны подвергаться автоклавной обработке перед их сжиганием.

6.8 Мойка

Многократно используемое оборудование моют только после его обеззараживания. По окончании мойки все оборудование ополаскивают деионизированной водой.

Для облегчения операций по очистке может быть использовано специализированное оборудование (например, моечные устройства для пипеток, чашек, ультразвуковые аппараты).

После мойки многократно используемое оборудование не должно содержать остатки, способные оказывать влияние на последующий рост микроорганизмов.

7 Приготовление и стерилизация питательных сред

Питательные среды подготавливают и стерилизуют в соответствии с ISO/TS 11133-1 и ISO/TS 11133-2.

8 Лабораторные пробы

8.1 Отбор проб

8.1.1 Общие требования

Описание отбора проб и планы отбора проб, несмотря их на чрезвычайную важность для интерпретации получаемых результатов, не являются предметом рассмотрения настоящего стандарта. Важно, чтобы лаборатория получала пробы, которые были бы действительно репрезентативными для партии продукции и не были бы повреждены или изменены во время транспортирования или хранения.

Необходимо обеспечить сохранность пробы от внешних загрязнений, причиной которых может являться окружающий воздух, емкость, в которой хранится проба, используемые приспособления для отбора проб и ненадлежащее обращение с пробой. Емкость с пробой следует заполнять не более чем на три четверти, чтобы избежать утечки и обеспечить надлежащее перемешивание пробы в лаборатории.

Пробы должны иметь четкую и полную идентификацию, информация о пробах регистрируется.

Нередко значения температуры на момент отбора пробы и по ее получении могут быть полезны лаборатории для интерпретации результатов.

Проба должна предоставляться в оригинальной емкости, которая перед этим не открывалась.

Если продукт объемный или он находится в емкости, слишком большой, чтобы доставить ее в лабораторию, его навеску асептически переносят в стерильную емкость.

Стерильная емкость для пробы должна быть открыта только на время, достаточное, чтобы поместить туда пробу, и немедленно закрыта после этого.

8.1.2 План отбора проб

Описание отбора проб не является предметом рассмотрения настоящего стандарта. См. имеющиеся специализированные стандарты на соответствующую продукцию.

8.2 Транспортирование

Способ транспортирования проб в лабораторию должен гарантировать их сохранение в условиях, позволяющих свести к минимуму любые изменения количества микроорганизмов, которые в них присутствуют.

Пробы доставляют в лабораторию в сжатые сроки, с предельно возможным соблюдением исходных условий хранения.

Пробу следует упаковывать так, чтобы предотвратить повреждение упаковки и обеспечить сохранность пробы.

Информация о необходимости охлаждения продукта должна содержаться на его этикетке.

Пробы, которые не требуют охлаждения или замораживания, могут быть упакованы в емкость с использованием соответствующего, устойчивого к повреждениям упаковочного материала.

Не следует использовать лед россыпью, так как это может привести к заражению продукта при повреждении или протечке емкости.

Если в специализированных стандартах не указано иное (например, ISO 6887 и ISO 8261), рекомендуется обеспечивать при транспортировании следующие значения температур:

– устойчивые продукты: температура окружающей среды (ниже 40 °C);

– замороженные продукты и продукты глубокой заморозки: ниже минус 15 °C, предпочтительно ниже минус 18 °C;

– прочие продукты, не устойчивые при температуре окружающей среды: от 1 °C до 8 °C;

– пробы-мазки: см. ISO 18593 и ISO 17604.

Если конкретные условия не определены, заинтересованным сторонам рекомендуется согласовать продолжительность и температуру транспортирования.

8.3 Приемка

При поступлении проб необходимо проверить их состояние.

Если состояние неудовлетворительное или пробы недостаточны, лаборатория должна отбраковать их. В особых случаях можно провести испытания таких проб после переговоров и согласования с заявителем. При этом протокол испытаний должен содержать информацию по поводу достоверности полученных результатов.

Принятые лабораторией пробы документируют таким образом, чтобы их движение вплоть до составления протокола испытаний можно было проконтролировать. Идентичность проб и записей и их кодирование должны обеспечивать прослеживаемость на каждом этапе работ в лаборатории.

При необходимости внешние поверхности емкостей дезинфицируют с применением соответствующих дезинфицирующих средств. Емкости с пробами проверяют на отсутствие видимых физических повреждений.

Фиксируют следующую информацию:

– дату (при необходимости также и время) поступления пробы;

– особенности процедуры отбора проб (дату и время отбора, если они необходимы и известны; условия отбора);

– наименование и адрес заявителя.

При поступлении скоропортящихся проб регистрируют температуру транспортирования или температуру модельной пробы, предоставленной для этих целей.

Исследования проб выполняют в кратчайшие сроки, предпочтительно в течение 24 ч после их поступления, либо в сроки, согласованные с заинтересованными сторонами.

Испытания наиболее скоропортящихся продуктов (например, моллюсков и ракообразных) должны проводиться в срок не более 24 ч после отбора проб. Испытания других скоропортящихся продуктов (таких как рыба, сырое молоко) должны проводиться в срок до 36 ч.

Если соблюдение предельных сроков, указанных выше, не представляется возможным, пробы могут быть заморожены при температуре ниже минус 15 °С, предпочтительно минус 18 °С, при условии подтверждения того, что выделение целевого микроорганизма (микроорганизмов) для соответствующей матрицы происходит без существенных ухудшений.

8.4 Хранение

Пробы перед исследованием хранят в условиях, сводящих к минимуму любые изменения количества микроорганизмов, которые в них присутствуют.

Рекомендуется соблюдать следующие значения температуры хранения:

– устойчивые продукты: температура окружающей среды (от 18 °С до 27 °С);

– замороженные продукты и продукты глубокой заморозки: ниже минус 15 °С, предпочтительно ниже минус 18 °С;

– прочие продукты, не устойчивые при температуре окружающей среды, включая испорченные пищевые продукты: (3 ± 2) °С (см. ISO 6887-2 – ISO 6887-4 или ISO 8261);

– пробы-мазки: см. ISO 18593 и ISO 17604.

8.5 Навеска пробы

8.5.1 Специальные правила отбора навесок пробы

Специальные правила по отбору навесок пробы и подготовке гомогенизированной пробы и первичной суспензии – в соответствующей части ISO 6887 или ISO 8261.

8.5.2 Консервация и уничтожение лабораторных проб

Кроме особых случаев, лабораторные пробы сохраняют до получения всех результатов анализов, а при необходимости и более длительное время, упаковав их в стерильную емкость (например, в пластиковый пакет), и при исходной температуре хранения.

Скоропортящиеся продукты подлежат заморозке.

Примечание – Повторные испытания проб не являются обычно принятой практикой, что связано с возможными изменениями их микробиологического статуса.

9 Исследования

9.1 Гигиенические меры предосторожности при проведении исследований

Во избежание заражения окружающей среды и навесок рекомендуется работать с порошкообразными (дегидратированными) продуктами в отдельном помещении, зоне или защитном боксе.

Перед открыванием обычных проб область вокруг планируемого места вскрытия упаковки протирают 70%-ным (объемная доля) этиловым спиртом (или иным аналогичным продуктом) и позволяют ему испариться. Перед вскрытием стерильных упаковок место вскрытия погружают в раствор, содержащий от 100 ppm до 200 ppm свободного хлора (или другого подходящего стерилизатора) не менее чем на 10 мин для уничтожения микроорганизмов, способных заразить пробу.

Любой инструмент, который применяют для вскрытия упаковки и для извлечения из нее всей пробы или ее части (консервный нож, ножницы, ложка, пинцет, пипетка и т. д.), должен быть стерильным.

Окружающую поверхность в рабочей зоне до начала испытаний очищают и протирают подходящим дезинфицирующим средством.

Руки моют непосредственно перед началом испытаний, а также, если они были загрязнены, в процессе испытаний.

Обеспечивают стерильность всех используемых инструментов и оберегают их от заражения до начала и в процессе использования. Все инструменты и приспособления укладывают в подходящую емкость для последующего уничтожения или стерилизации.

Принимают необходимые меры предосторожности для того, чтобы работа выполнялась, насколько это возможно, в асептических условиях.

Например:

a) удостоверяются, что рабочая зона является чистой, что все возможные источники заражения устранены или их влияние сведено к минимуму и что в помещении отсутствуют сквозняки (т. е. окна и двери закрыты), кроме того, сотрудники избегают ненужных движений при выполнении исследований;

b) до и после работы обеззараживают рабочую поверхность подходящим дезинфицирующим средством;

c) перед началом работы удостоверяются, что все необходимое для ее проведения имеется в наличии (и отсутствуют лишние предметы);

d) работу выполняют как можно быстрее;

e) разделяют «чистые» и «грязные» виды деятельности по времени и месту (это особенно важно в случае с пробами, относящимися к высокой категории риска, такими как сырое мясо и сырые яйца);

f) используют одноразовое оборудование;

g) если упаковка одноразовых пипеток, чашек Петри и т. п. в процессе исследований расходуется не полностью, удостоверяются, что она была надлежащим образом закрыта после извлечения из нее необходимого количества предметов;

h) немедленно удаляют любые брызги при помощи ватных тампонов или любых других подходящих материалов, пропитанных 70%-ным (объемная доля) этиловым спиртом или другим дезинфицирующим средством [1]; перед продолжением работы рабочую поверхность очищают и дезинфицируют;

i) для работы с продуктами, в которых предполагается содержание патогенных бактерий, используют защитный бокс, если данное установлено национальными санитарными правилами;

j) при извлечении стерильной пипетки из коробки следят за тем, чтобы ее кончик не касался боковых поверхностей пипеток, остающихся в коробке, поскольку такие поверхности подвержены загрязнению;

k) не допускают касания пипеткой венчика или горловины флаконов для разведения.

Аэрозоли являются основной причиной заражения окружающей среды и распространения инфекции. Аэрозоли могут образовываться, например:

- при открывании чашек Петри, пробирок и флаконов;
- при использовании смесителей, шприцев, центрифуг и т. д.;
- при опорожнении пипеток;
- при стерилизации петель или игл после влажной инокуляции;
- при открывании ампул, содержащих лиофилизированные культуры.

Исходя из этого, образование аэрозолей необходимо свести к минимуму.

Для молекулярных методов принимают дополнительные меры ISO 22174.

9.2 Приготовление первичной суспензии и разведений

9.2.1 Общие требования

Первичную суспензию и разведения приготавливают, как указано в соответствующей части ISO 6887 или ISO 8261. Период времени между окончанием приготовления первичной суспензии и посевом на питательную среду не должен превышать 45 мин, если в соответствующем международном стандарте не указано иное.

За этапами приготовления первичной суспензии и разведений могут следовать этапы обогащения, как описано в специализированных стандартах.

9.2.2 Обогащение

9.2.2.1 Центрифугирование или мембранная фильтрация

Если требуется произвести подсчет малых количеств микроорганизмов, качество подсчета как по чувствительности, так и по прецизионности может быть улучшено путем получения более насыщенной навески. На данном этапе концентрацию можно увеличить путем центрифугирования или мембранной фильтрации.

Полученный посредством центрифугирования осадок снова разводят в известном количестве разбавителя и продолжают исследования.

---

[1] При использовании дезинфицирующих средств, отличных от 70%-ного (объемная доля) этилового спирта, для эффективной дезинфекции требуется соблюдать соответствующее время контакта с ними в соответствии с инструкциями изготовителя.

По каждой изучаемой комбинации (пищевого продукта и микроорганизма) выполняют предварительное исследование (см., например, ссылку [23]) для выяснения, является ли введение этапа насыщения необходимым и оправданным. Оценивают также пригодность суспензии пищевого продукта к фильтрации.

В целом проверяют эффективность метода с точки зрения его чувствительности, избирательности, линейности и воспроизводимости. Если уровень заражения неизвестен, одновременно должен быть применен стандартный метод (без фильтрации).

9.2.2.2 Иммуносепарация

Если в пробе присутствует малое количество целевых микроорганизмов, их сепарация и повышение концентрации могут быть достигнуты с помощью микромагнитных шариков, покрытых специальными антителами.

Шарики вместе с захваченными ими целевыми микроорганизмами распределяют непосредственно по поверхности определенной твердой среды в соответствии со специализированными стандартами. Впрочем, необходимо проверять, являются ли иммуномагнитные шарики, покрытые специальными антителами и используемые на этапе насыщения, пригодными для этой цели, исходя из оценочных исследований, результаты которых опубликованы в международной научной литературе, желательно посвященной вопросам микробиологии пищевых продуктов. Важность такой проверки особенно высока, если соответствующая методика не прошла валидацию в соответствии с ISO 16140.

10 Определение количества микроорганизмов

10.1 Общие требования

При оценке микробиологического качества и/или безопасности пищевой продукции и кормов зачастую недостаточно знать лишь о том, какие микроорганизмы в них присутствуют. В большинстве случаев количественный аспект также важен, что означает необходимость их подсчета. Он может выполняться различными способами: путем непосредственного (микроскопического) исследования, путем посева на плотные или жидкие среды, методами потоковой цитометрии, при помощи цепной реакции полимеразы в реальном времени и т. п. В настоящем стандарте описываются только методы подсчета с использованием твердой и жидкой среды.

Подсчет на плотной среде основывается на способности многих микроорганизмов к образованию колоний на поверхности или в толще агаровой среды, что позволяет обнаруживать их невооруженным глазом или при помощи простого увеличительного стекла. Тем не менее, если матрица содержит большое количество частиц, которые могут затруднять обнаружение колоний, или если уровень содержания бактерий очень низок, этот принцип не может использоваться без первоначального отделения целевых микроорганизмов от матрицы (например, путем фильтрации или иммуносепарации). В таких случаях приемлемой альтернативой является подсчет микроорганизмов в жидких средах.

10.2 Подсчет микроорганизмов с использованием плотной питательной среды

10.2.1 Общие требования

Чашка Петри должна иметь маркировку с указанием номера пробы, разведения, даты и прочей необходимой информации.

Разведения должны подбираться таким образом, чтобы гарантировать получение чашек с приемлемым числом колоний (см. 10.3.1) и предупредить любое возможное ингибирующее воздействие на микроорганизмы.

Для переноса материала из каждого разведения используют отдельную стерильную пипетку, за исключением случаев, когда осуществляется переход от самого большого разведения к самому малому.

10.2.2 Количество чашек Петри на каждое разведение

При реализации методик микробиологических исследований пищевой продукции в лабораториях, которые располагают системой обеспечения качества работ, соответствующей принципам ISO 17025, необходимо применять как минимум два последовательных разведения пробы, причем на каждое разведение засевается одна чашка Петри. Если выполняется только одно разведение или если указанная система в лаборатории не применяется, необходимо использовать две чашки согласно ISO 8199.

10.2.3 Методики с использованием глубинного посева

10.2.3.1 Общие требования

Отбирают предусмотренные объемы разведений для исследования, при этом кончиком пипетки касаются стенок пробирки, чтобы удалить избыточную жидкость с его наружной поверхности. Приподнимают крышку стерильной чашки Петри на высоту, достаточную, чтобы поместить туда пипетку, затем распределяют ее содержимое. Расплавленную плотную агаризованную питательную среду при температуре от 44 °С до 47 °С наливают в каждую чашку Петри [2], избегая попадания расплавленной среды непосредственно на посевной материал. Незамедлительно и тщательно перемешивают расплавленную питательную среду с посевным материалом так, чтобы микроорганизмы равномерно распределились в ее массе. Для охлаждения и застывания чашки Петри оставляют на холодной горизонтальной поверхности (время затвердевания агара не должно превышать 10 мин).

После извлечения темперированной агаризованной среды из водяной бани флакон насухо промакивают чистым полотенцем, чтобы вода не стала причиной заражения чашек. Избегают попадания брызг питательной среды на наружную поверхность емкости или на внутреннюю поверхность крышки в процессе разливки.

Для этого может потребоваться держать флакон в почти горизонтальном положении или удерживать его все время на весу в промежутках времени между заливками.

Если в исследуемом продукте предполагается присутствие микроорганизмов, образующих при росте налет на поверхности среды («ползучий» рост колоний, например Proteus spp.), то застывшие чашки заливают сверху стерильным «голодным» агаром или же агаром, идентичным питательной среде, которая используется для испытаний [3], чтобы предотвратить и/или уменьшить расползание колоний.

10.2.4 Поверхностный посев

10.2.4.1 Общие требования

Методы посева микроорганизмов на слой агаризованной притательной среды в чашке Петри, позволяющие получать только поверхностные колонии, имеют определенные преимущества перед методом глубинного посева. За морфологией колоний, расположенных на поверхности агаровой среды, проще наблюдать, и это облегчает работу по распознаванию различных типов колоний.

Микроорганизмы не страдают от воздействия тепла расплавленного агара, благодаря чему удается вырастить более значительное их количество.

В этом случае используют заранее отлитые ровные чашки с агаризованной средой толщиной не менее 3 мм, без воздушных пузырьков и влаги на поверхности.

Для равномерного распределения микроорганизмов по поверхности застывшего агара его подсушивают, как указано в ISO/TS 11133 или другом применяемом стандарте, таким образом, чтобы продолжительность впитывания посевного материала находилась в пределах 15 мин.

10.2.4.2 Метод распределения шпателем

При помощи стерильной пипетки переносят посевной материал (обычно 0,1 или 0,5 мл) из жидкой пробы для испытаний или в случае с другими видами проб из первичной суспензии на слой агаризованной притательной среды в чашке Петри (90 или 140 мм в диаметре соответственно). Этот шаг повторяют для следующего десятичного разведения (колонии для подсчета будут в таком случае присутствовать на шаге разбавления 10^{-1} в случае с жидким материалом пробы и 10^{-2} с другим материалом пробы) и, если необходимо, выполняют его для дальнейших десятичных разведений.

Если существует необходимость произвести подсчет малых количеств микроорганизмов в некоторых видах продуктов, предел обнаружения может быть увеличен с коэффициентом 10 при анализе 1,0 мл пробы в случае с жидкими продуктами и 1,0 мл первичной суспензии в случае с другими продуктами. Для этой цели 1,0 мл посевного материала распределяют либо по поверхности большой чашки Петри (140 мм в диаметре), либо по поверхности трех небольших чашек Петри (90 мм в диаметре).

При помощи шпателя, выполненного из стекла, пластика или стали (например, изогнутой стеклянной палочки, заостренной наподобие хоккейной клюшки в виде стержня 3,5 мм диаметром и длиной 20 см, с изгибом под прямыми углами на расстоянии приблизительно 3 см с одного конца и сплющенного с обоих концов путем нагрева), посевной материал как можно быстрее равномерно распределяют по поверхности агара, не касаясь стенок чашки. После этого чашку Петри накрывают крышкой и дают посевному материалу впитаться в течение около 15 мин при комнатной температуре.

---

[2] Обычно от 18 до 20 мл агара в чашках Петри вместимостью 90 мм для получения слоя не менее 3 мм.

[3] Обычно 5 мл агара в чашках Петри вместимостью 90 мм.

В некоторых случаях, установленных соответствующими стандартами, посевной материал может быть сначала перенесен на мембрану и затем распределен, как описано выше.

10.2.4.3 Метод спирального посева

10.2.4.3.1 Общие требования

Метод спирального посева для определения уровня содержания микроорганизмов был испытан путем межлабораторных сличений на молоке, молочных продуктах и другой пищевой продукции.

Специальное оборудование, используемое для посева по этому методу, описано в 5.24 настоящего стандарта.

10.2.4.3.2 Разливка сред

Для приготовления чашки Петри с агаризованной средой рекомендуется использовать автоматический дозатор со стерильной системой подачи, что способствует получению слоя с ровной поверхностью.

На заливку каждой чашки должно расходоваться одинаковое количество агара, это позволяет рабочей части пера автоматического аппарата для спирального посева приближаться к поверхности агара на одной и той же высоте, обеспечивающей необходимый угол контакта.

В качестве альтернативы можно применять серийно выпускаемые готовые чашки Петри с агаризованной средой.

10.2.4.3.3 Методика посева и определения количества микроорганизмов

Перед подачей жидкой пробы к перу аппарата рабочую часть пера и трубки предварительно обеззараживают, пропуская через систему сначала раствор гидроокиси натрия (см. 5.24.4), а затем стерильную воду.

Предварительно разлитую чашку Петри с агаризованной средой помещают на вращающийся поддон и опускают перо. При вращении чашки перо движется по ее поверхности, дифференцированно распределяя пробу. Засеянную чашку удаляют и возвращают перо в исходное положение. Перо обеззараживают, после чего загружают для посева следующую чашку Петри.

После инкубирования располагают счетную сетку по центру спирально засеянной чашки. Для определения количества колоний используют правило двадцати. Выбирают произвольный сектор и начинают подсчет колоний от наружного края первого сегмента по направлению к центру, пока количество подсчитанных колоний не достигнет 20. Подсчитывают оставшиеся колонии в сегменте, содержащем двадцатую колонию. Производят подсчет в соответствующей области на противоположной стороне чашки и делят количество колоний, подсчитанных с обеих сторон, на объем пробы, который был израсходован в этих двух областях. Значения распределяемого объема пробы для каждой части счетной сетки приведены в руководстве по эксплуатации, которое прилагается ко всем аппаратам для спирального посева.

10.2.5 Инкубирование

Если в специализированных стандартах не указано иное, засеянные чашки немедленно переворачивают и быстро помещают их в термостат, установленный на соответствующее значение температуры. Если наблюдается чрезмерное обезвоживание среды (например, при 55 °С или вследствие интенсивной циркуляции воздуха), чашки перед инкубированием в термостате неплотно укладывают в пластиковые пакеты или используют аналогичные средства с тем же эффектом.

В период термостатирования допускаются как неизбежные незначительные колебания температуры, например, во время таких обычных операций, как загрузка или разгрузка термостата. Продолжительность подобных колебаний необходимо контролировать, чтобы убедиться, что они не оказывают существенного влияния на результаты испытаний.

Примечание – В отдельных случаях, чтобы не спутать частицы исследуемого продукта с колониями микроорганизмов, полезно сохранять дубликаты засеянных чашек при температуре (3 ± 2) °С для последующего сопоставления с инкубированными засеянными чашками при подсчете.

При определенных обстоятельствах для организации работ в лаборатории может быть целесообразным до инкубирования хранить засеянные чашки в холодильнике в течение срока, который не должен превышать 24 ч. Если это делается, лаборатория должна гарантировать, что такие действия не повлияют на результаты подсчета микроорганизмов.

Как правило, для аэробного инкубирования чашки Петри не должны устанавливаться друг на друга в количестве более шести штук и должны отстоять друг от друга и от стенок термостата как минимум на 25 мм. Несмотря на это, использование более высоких стопок чашек с меньшим расстоянием между чашками может быть допустимым в термостатах, оборудованных системами воздушной циркуляции, в этом случае необходимо следить за распределением температур.

После инкубирования чашки обычно немедленно подвергаются исследованию. Тем не менее, если иное не указано в специализированных стандартах, их можно поместить для хранения в холодильник на срок до 48 ч. Дальнейшее хранение в холодильнике допускается, только если было доказано, что оно не влияет на число, внешний вид и последующее подтверждение количества колоний. При использовании некоторых сред, содержащих индикаторные красители, охлажденные чашки перед исследованием необходимо стабилизировать при комнатной температуре, чтобы гарантировать восстановление их достоверного цвета.

10.3 Расчет и выражение результатов, получаемых на плотных средах

10.3.1 Подсчет колоний

По истечении периода термостатирования, установленного соответствующим стандартом, определяют количество колоний (общее количество колоний, количество типичных колоний или предполагаемых колоний) для каждой чашки, содержащей менее 300 колоний (или менее другого количества, установленного соответствующим специализированным стандартом).

При подсчете типичных или предполагаемых колоний описание колоний должно соответствовать установленному в соответствующем специализированном стандарте.

В некоторых случаях подсчет колоний может быть затруднен (например, в присутствии «ползучих» микроорганизмов). «Ползучие» колонии рассматривают как одиночные. Если налетом покрыто менее четверти чашки, определяют число колоний в незатронутой части чашки и вычисляют по нему количество для всей чашки. Выводят из него путем экстраполяции теоретическое количество, которое должно соответствовать всей чашке. Если налетом покрыто боле четверти чашки, результаты подсчета не учитывают. «Ползучие» колонии в форме цепочки рассматривают как одну колонию.

При использовании различных методов расчета, приведенных в 10.3.2, необходимо учитывать чашки, не содержащие колоний, если эти чашки были сохранены.

Если используется аппарат для спирального посева, подсчет колоний выполняют, как описано в 10.2.4.3.3.

10.3.2 Обработка результатов

10.3.2.1 Общие требования

10.3.2.1.1 Случаи, описанные в настоящем подпункте, являются общими:

– посев одной чашки Петри 90 мм в диаметре на разведение;

– максимальное подсчитанное количество всех содержащихся в чашке колоний: 300 на чашку;

– максимальное общее количество колоний (типичных и атипичных), содержащихся в чашке, при подсчете типичных или предполагаемых колоний: предпочтительно 300 на чашку;

– максимальное подсчитанное количество типичных или предполагаемых колоний: 150 на чашку;

– количество предполагаемых колоний, посеянных с целью идентификации или подтверждения (см. 10.3.2.3) в каждой выбранной чашке: в общем случае 5.

Такие значения определяются специализированными стандартами.

При использовании чашек с диаметром, отличным от 90 мм, максимальное количество колоний должно быть увеличено или уменьшено пропорционально площади поверхности чашек (или мембран).

10.3.2.1.2 Методы расчета, приведенные ниже, применяются для наиболее распространенных ситуаций, когда испытания проводятся в соответствии с надлежащей лабораторной практикой. Изредка возможны и особые случаи (например, соотношение коэффициентов разведения, используемых для двух последовательных разведений, может очень сильно варьироваться), и поэтому требуется, чтобы получаемые результаты подсчета были изучены и интерпретированы квалифицированным микробиологом и при необходимости отбракованы.

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

Для получения достоверных результатов в общем случае требуется подсчет колоний не менее чем в одной чашке, которая содержала бы не менее 10 колоний [всех колоний, типичных колоний или колоний, отвечающих критериям идентификации (см. 10.3.2.3)].

Рассчитывают количество N микроорганизмов, содержащихся в испытуемой пробе, как среднее взвешенное для двух последовательных разведений по формуле (1)

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1{,}1 \times d}, \quad (1)$$

где $\sum C$ – сумма колоний, подсчитанных на двух чашках, выбранных в двух последовательных разведениях, из которых хотя бы одна содержит не менее 10 колоний;

V – объем посевного материала, внесенного в каждую чашку, мл;

d – коэффициент разбавления, соответствующий первому выбранному разбавлению [d = 1, если используется неразведенный жидкий продукт (проба для испытаний)].

Результат вычислений округляют до двух значащих цифр. Для этого, если третья цифра меньше 5, предшествующую цифру не изменяют; если третья цифра больше или равна 5, предшествующую цифру увеличивают на единицу.

Желательно, чтобы результат выражался числом между 1,0 и 9,9, умноженным на 10 в соответствующей степени, или целым числом с двумя значащими цифрами.

Результат представляют как число N микроорганизмов на миллилитр (жидкие продукты) или на грамм (прочие продукты).

Пример – При подсчете получены следующие результаты:

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

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

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1{,}1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1{,}1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0{,}011} = 16\,545$$

Округление результата, как показано выше, дает количество микроорганизмов, равное 17 000, или $1{,}7 \times 10^4$ на миллилитр или на грамм продукции.

10.3.2.3 Метод расчета: после идентификации

Если используемый метод предполагает идентификацию, на каждой чашке, выбранной для подсчета колоний, определяют заданное количество A предполагаемых колоний (обычно 5). После идентификации для каждой из чашек вычисляют количество a колоний, соответствующих критериям идентификации, с использованием уравнения:

$$a = \frac{b}{A} \times C, \quad (2)$$

где b – это количество колоний, соответствующих критериям идентификации, среди идентифицированных колоний A;

C – это общее количество предполагаемых колоний, подсчитанных на чашке.

Результат вычислений округляют до ближайшего целого числа. В этом случае, если первая цифра после десятичной точки менее 5, предшествующую цифру не изменяют; если первая цифра после десятичной точки больше или равна 5, предшествующую цифру увеличивают на одну единицу.

Рассчитывают количество N идентифицированных микроорганизмов, представленных в пробе для испытаний путем замены ΣC на Σa в уравнении, которое приведено в 10.3.2.2.

Округляют результат, как показано в 10.3.2.2.

Выражают результат, как показано в 10.3.2.2.

Пример – При расчетах были получены следующие результаты:

– на первом выбранном разведении (10^{-3}): 66 колоний;

– на втором выбранном разведении (10^{-4}): 4 колонии.

Проводятся испытания выбранных колоний:

– из 66 колоний 8 были испытаны, 6 из них отвечают критериям, следовательно, a = 50;

– из 4 колоний все 4 отвечают критериям, следовательно, a = 4.

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1{,}1 \times d} = \frac{50 + 4}{1 \times 1{,}1 \times 10^{-3}} = \frac{54}{1{,}1 \times 10^{-3}} = 49\,090.$$

Округление результата, как показано в 10.3.2.2, дает количество микроорганизмов, равное 49 000, или $4{,}9 \times 10^4$ на миллилитр или на грамм продукции.

10.3.2.4 Метод расчета: малые количества

10.3.2.4.1 Случаи, когда одна чашка (с пробой для испытаний, первичной суспензией или первым разведением) содержит менее 10 колоний

Количества от 10 и до (практического) верхнего предела каждого метода находятся в оптимальном диапазоне прецизионности. Прецизионность резко уменьшается, если количество колоний снижается

до значения менее 10. В зависимости от цели испытаний нижний предел определения для количества колоний менее 10 может быть установлен, как показано ниже.

В соответствии с ISO/TR 13843 предел определения – это «наименьшая средняя концентрация частиц x на навеску аналитической пробы, при которой ожидаемая относительная стандартная неопределенность соответствует установленному значению (RSD)». RSD означает относительное стандартное отклонение, которое рассчитывается путем деления оценки стандартного отклонения s для популяции из пробы на среднее значение X для этой пробы. Вместо обозначения RSD для относительного стандартного отклонения далее будет использоваться символ w. Таким образом, $w = s/X$.

При распределении Пуассона x рассчитывают по формуле

$$x = \frac{1}{(w)^2}.$$

Если в качестве предела допускаемой относительной прецизионности принимается w со значением 50 % (что выглядит оправданным для целей микробиологии), нижний предел определения будет соответствовать количеству колоний, рассчитанному как:

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

Таким образом, результаты, основанные на числах менее 4, следует рассматривать как простое обнаружение присутствия микроорганизмов.

Выводы:

Если чашка содержит до 10 колоний, но не менее 4, результат вычисляют, как показано для общего случая (10.3.2.2), и выражают его как оцененное количество x микроорганизмов на миллилитр (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов).

Если общее количество колоний составляет от 3 до 1, прецизионность результата признается слишком низкой и в протоколе указывают следующий результат:

«количество микроорганизмов менее ($4 \times d$) на грамм или миллилитр».

10.3.2.4.2 Случаи, когда чашка (с пробой для испытаний, первичной суспензией или первым разведением) не содержит колоний

Если чашка с пробой для испытаний (жидкие продукты), первичной суспензией (прочие продукты) или первым посеянным или выбранным разведением не содержит колоний, в протоколе указывают следующий результат:

«менее $1/d$ микроорганизмов на миллилитр» (жидкие продукты) или «менее $1/d$ микроорганизмов на грамм» (прочие продукты),

где d – это коэффициент разведения первичной суспензии или первого посеянного или выбранного разведения ($d = 10^0 = 1$, если выбирается непосредственно высеянная проба для испытаний или жидкий продукт).

10.3.2.4.3 Особые случаи

10.3.2.4.3.1 Общие требования

В этих случаях речь идет о подсчете типичных или предполагаемых колоний.

10.3.2.4.3.2 Случай 1

Если количество типичных и атипичных колоний в чашке, содержащей первое разведение d_1, превышает 300 (или любое другое число, указанное в специализированном стандарте), если имеются видимые типичные колонии или подтвержденные колонии и если в чашке, содержащей последующее разведение d_2, насчитывается менее 300 колоний (или любого другого числа, указанного в специализированном стандарте) и отсутствуют видимые типичные или подтвержденные колонии, в протоколе указывают следующий результат:

«менее $1/d_2$ и более $1/d_1$ микроорганизмов на миллилитр» (для жидких продуктов) или «менее $1/d_2$ и более $1/d_1$ микроорганизмов на грамм» (для прочих продуктов),

где d_1 и d_2 – это коэффициенты разведения, соответствующие разведению d_1 и d_2.

Пример – При подсчете получены следующие результаты:

– в первом выбранном разведении (10^{-2}): более 300 колоний в чашке, имеются типичные или подтвержденные колонии;

– во втором выбранном разведении (10^{-3}): 33 колонии, типичные или подтвержденные колонии отсутствуют.

Результат, выражаемый в количестве микроорганизмов, составляет менее 1 000 и более 100 микроорганизмов на миллилитр или грамм продукта.

10.3.2.4.3.3 Случай 2

Если количество типичных и атипичных колоний в чашке, содержащей первое разведение d_1, превышает 300 (или любое другое число, установленное в специализированном стандарте), при этом отсутствуют видимые типичные колонии или подтвержденные колонии, если в чашке, содержащей последующее разведение d_2, насчитывается менее 300 колоний (или любого другого числа, указанного в специализированном стандарте) и отсутствуют типичные или подтвержденные колонии, в протоколе указывают следующий результат:

«менее $1/d_2$ микроорганизмов на миллилитр» (для жидких продуктов) и «менее $1/d_2$ микроорганизмов на грамм» (для прочих продуктов),

где d_2 – это коэффициент разведения, соответствующий разведению d_2.

Пример – При подсчете получены следующие результаты:

– в первом выбранном разведении (10^{-2}): более 300 колоний в чашке, типичные или подтвержденные колонии отсутствуют;

– во втором выбранном разведении (10^{-3}): 33 колонии, типичные или подтвержденные колонии отсутствуют;

– результат, выражаемый в количестве микроорганизмов, составляет менее 1 000 на миллилитр или на грамм продукта.

10.3.2.5 Метод расчета: особые случаи

10.3.2.5.1 Если подсчитанное количество колоний (общее количество колоний, количество типичных колоний или предполагаемых колоний) превышает 300 (или любое другое число, указанное в специальном стандарте) в чашке, содержащей первое разведение d_1, при этом количество колоний (общее количество колоний, количество типичных колоний или колоний, соответствующих критериям идентификации) составляет менее 10 в чашке, содержащей последующее разведение d_2:

– если количество колоний в чашке, содержащей разведение d_1, находится в интервале от 334 до 300 (верхняя часть доверительного интервала для средневзвешенного значения, равного 300), используют метод расчета, предусмотренный для общих случаев (см. 10.3.2.2);

– если количество колоний в чашке, содержащей разведение d_1, превышает 334 (верхний предел доверительного интервала для средневзвешенного значения, равного 300), учитывают только результаты подсчета в разведении d_2 и вычисляют оцененное количество (см. 10.3.2.4), кроме случаев, когда для количества колоний было установлено максимальное значение 300, если это оцененное количество составляет менее 8 (нижний предел доверительного интервала для средневзвешенного значения, равного 10), поскольку расхождение между двумя разведениями в таком случае является неприемлемым.

Числа, соответствующие доверительным интервалам, должны быть адаптированы к максимальному количеству, установленному для подсчетов колоний.

Примеры

1 При подсчете были получены следующие результаты:

– в первом выбранном разведении (10^{-2}): 310 колоний;

– во втором выбранном разведении (10^{-3}): 8 колоний.

Используют метод расчета, предусмотренный для общих случаев, с использованием двух выбранных разведений.

2 При подсчете были получены следующие результаты:

– в первом выбранном разведении (10^{-2}): более 334 колоний на чашку;

– во втором выбранном разведении (10^{-3}): 9 колоний.

В протоколе указывают оцененное значение, исходя из количества колоний, подсчитанных в чашке с разведением 10^{-3}.

3 При подсчете (если установлено, что максимальное подсчитанное количество колоний должно равняться 300) были получены следующие результаты:

– в первом выбранном разведении (10^{-2}): более 334 колоний на чашку;

– во втором выбранном разведении (10^{-3}): 7 колоний.

Результаты подсчета признаются неудовлетворительными.

4 При подсчете (если установлено, что максимальное подсчитанное количество колоний должно равняться 300) были получены следующие результаты:

– в первом выбранном разведении (10^{-2}): более 167 колоний на чашку (верхний предел доверительного интервала со средневзвешенным значением, равным 150);

– во втором выбранном разведении (10^{-3}): 7 колоний.

В протоколе указывают оцененное значение, исходя из количества колоний, подсчитанных в чашке с разведением 10^{-3} .

10.3.2.5.2 Если при подсчете количества колоний (общего количества колоний, количества типичных колоний или предполагаемых колоний) на каждой из чашек для всех посеянных разведений получено число, превышающее 300 (или любое другое число, указанное в специализированном стандарте), в протоколе указывают следующий результат:

«более 300/*d*» (в случае с общим количеством колоний или типичным количеством колоний) либо «более 300 × *b*/*A* × 1/*d*» (в случае с подтвержденным количеством колоний), выражаемый в микроорганизмах на миллилитр (для жидких продуктов) или микроорганизмах на грамм (для прочих продуктов),

где *d* – это коэффициент разведения для последнего посеянного разведения;

b – это количество колоний, соответствующих критериям идентификации, среди предполагаемых колоний *A*.

10.3.2.5.3 Если в чашке, содержащей последнее посеянное разведение, содержится более 10 и менее 300 (или любое другое количество, указанное в специализированном стандарте) колоний (общее количество колоний, количество типичных колоний или предполагаемых колоний), вычисляют количество *N'* имеющихся микроорганизмов с использованием формулы

$$N' = \frac{c}{V \times d}, \tag{4}$$

где *c* – количество колоний, подсчитанных в чашке;

V – количество посевного материала, использованного для каждой чашки, мл;

d – коэффициент разведения, соответствующий выбранному разведению.

Результат округляют, как показано в 10.3.2.2.

В протоколе указывают результат как количество *N* микроорганизмов (для жидких продуктов) или на грамм (для прочих продуктов).

Пример – При подсчете были получены следующие результаты:
– в последнем посеянном разведении (10^{-4}): 120 колоний.

$$N = \frac{120}{1 \times 10^{-4}} = 1\ 200\ 000.$$

Таким образом, при округлении результата, как показано в 10.3.2.2, количество N' микроорганизмов составляет 1 200 000 или 1,2 × 10^6 на миллилитр или на грамм продукта.

10.3.2.6 Измерение неопределенности

См. положения ISO/TS 19036 о количественном определении.

10.4 Определение количества дрожжей и плесневых грибков

10.4.1 Общие требования

Количество дрожжей и плесневых грибков обычно определяют либо по методу глубинного посева, который облегчает их подсчет, либо по методу поверхностного посева, который обеспечивает наилучший доступ атмосферного воздуха к клеткам и позволяет избежать тепловых перегрузок под воздействием расплавленного агара. Предварительно отлитые чашки Петри с агаризованной средой перед посевом подсушивают (см. ISO/TS 11133).

Некоторые дрожжи и плесневые грибки способны вызывать инфекционные заболевания или аллергические реакции, иногда даже у здоровых людей. Это означает, что необходимо уделять внимание разумным мерам безопасности при работе с ними. В идеальном случае чашки должны находиться в термостатах, а не на открытом воздухе в помещении. Крышки с чашек следует снимать как можно реже, обычно лишь для существенных целей, таких как подготовка среза для микроскопического исследования. Прокаленные иглы перед переносом ими материала охлаждают, чтобы избежать рассеивания конидий и прочих клеток. Рабочие столы и термостаты регулярно дезинфицируют.

Чашки Петри для инкубирования устанавливают вертикально и оставляют в неизменном положении до тех пор, пока чашки не будут готовы к подсчету, поскольку перемещение может спровоцировать выделение плесневых конидий или спор с последующим образованием колоний-спутников, что приведет к завышенной оценке популяции.

10.4.2 Подсчет колоний дрожжей и плесневых грибков

Чашки Петри с количеством колоний от 10 до 150 колоний обычно используются для подсчета. Если микрофлора преимущественно состоит из плесневых грибков, отбирают чашки, содержащие микроорганизмы в количествах, которые соответствуют нижнему диапазону популяции; если же микрофлора состоит преимущественно из дрожжей, для подсчета могут отбираться чашки, содержащие количества микроорганизмов вплоть до верхнего предела.

Если идентичность колоний вызывает сомнения, исследуют влажные или окрашенные препараты клеток из не менее 5 колоний для каждой пробы, чтобы убедиться в отсутствии бактерий.

10.5 Подсчет с использованием жидкой среды

10.5.1 Сущность метода

Навески высеваются в жидкую среду, которая приспособлена для того, чтобы поддерживать рост конкретного вида микроорганизмов или группы микроорганизмов, а также чтобы препятствовать размножению нецелевых микроорганизмов.

Для определения того, происходит ли рост целевых микроорганизмов, могут использоваться различные критерии, например видимая мутность, выделение газа, изменения цвета, последующая изоляция микроорганизмов на селективной агаровой среде. Состав питательной среды и критерии различения между положительными и отрицательными результатами определены в соответствующих стандартах.

При использовании данного подхода каждой навеске может быть приписано только качественное значение, т. е. результат может быть либо положительным, либо отрицательным. С целью количественной оценки имеющихся микроорганизмов необходимо подвергнуть исследованию несколько навесок и использовать статистические методики для определения их наиболее вероятного числа (НВЧ).

10.5.2 Посев

10.5.2.1 Общие требования

Если используется селективная плотная агаризованная питательная среда, добавление навески не должно ухудшать параметры ее селективности (давая тем самым возможность для роста нецелевых микроорганизмов). В большинстве стандартов информация о совместимости конкретной матрицы и жидкой среды приведена в описании области применения, тем не менее следует обращать внимание на такие матрицы, как специи, какао, бульоны и т. п., поскольку они могут содержать вещества, ингибирующие рост микроорганизмов и требующие добавления нейтрализующих составов, использования более высоких коэффициентов разведения, центрифугирования или иммуномагнитной сепарации для отделения целевых микроорганизмов от матрицы, даже если эти действия не всегда четко определены в соответствующих стандартах. Причиной несовместимости может быть также биологический состав матрицы: взятые из окружающей среды пробы с высокой степенью заражения, ферментированные продукты или продукты с пробиотическими бактериями, создают большие трудности для микробиолога-аналитика, нежели чем пробы, в которых содержатся лишь небольшие количества микроорганизмов. Для таких проблемных матриц необходимо проводить опыты с искусственным добавлением репрезентативных микроорганизмов, чтобы убедиться в фактической совместимости метода с той или иной матрицей.

10.5.2.2 Методика

Если в соответствующих стандартах не указано иное, объемы навески, не превышающие 1 мл, обычно добавляют к объему среды с одинарной концентрацией в пропорции от 1 : 5 до 1 : 10. Навески объемом 1 – 100 мл обычно добавляются к равным объемам среды с удвоенной концентрацией.

Для объемов, превышающих 100 мл, можно использовать более концентрированные среды. В особых случаях стерильная обезвоженная среда может растворяться в холодной (или подогретой до 30 °С) пробе для дальнейшего анализа.

Если не указано иное, промежуток времени между приготовлением первого разведения пробы и посевом в последнюю пробирку на многоячеечный планшет или во флакон должен составлять менее 15 мин.

Для каждого разведения используется новая стерильная пипетка.

10.5.3 Выбор системы посева

Сущность метода НВЧ состоит в разведении пробы до такой концентрации, чтобы посевные материалы в отдельных случаях содержали жизнеспособные микроорганизмы. «Выход», т. е. количество посевных материалов, обеспечивающих рост, в каждом разведении позволяет дать оценку первичной концентрации бактерий в пробе. Для получения оценки в широком диапазоне возможных концентраций микробиологами используются последовательные разведения, инкубирование нескольких пробирок (либо чашек и т. д.) в каждом разведении. Наиболее вероятное количество микроорганизмов, присутствующих в оригинальной пробе, и прецизионность оценки можно рассчитать статистическими методами, исходя из количества положительных и отрицательных пробирок, наблюдаемых после инкубирования.

Выбор между разнообразными имеющимися системами НВЧ осуществляют, исходя из:
– ожидаемого количества микроорганизмов в исследуемой пробе;
– нормативных требований;
– необходимой прецизионности;
– любых других практических соображений.

Неопределенность измерения здесь зависит от количества положительных навесок приблизительно таким же образом, как неопределенность измерения при подсчете колоний зависит от количества колоний на чашке. Неопределенность измерения возрастает как функция квадратного корня из количества использованных пробирок. Количество пробирок необходимо учетверить, чтобы уменьшить неопределенность измерения вдвое. При использовании систем, которые имеют лишь несколько повторных пробирок, неопределенность измерения невысока.

В зависимости от своего размера навески могут высеваться в пробирки или флаконы, содержащие необходимое количество жидкой среды. Для навесок с малым объемом могут также быть использованы многоячеечные планшеты.

10.5.3.1 Система одиночных разведений

Если ожидаемая концентрация микроорганизмов невелика или предполагается, что она может варьироваться лишь в ограниченных пределах, то наиболее подходящей является система посева, которая включает в себя одиночную серию одинаковых навесок. В случаях, когда ожидаемое соотношение между максимальным и минимальным количеством микроорганизмов ниже, чем приблизительно 25 : 1, десять параллельных навесок – это наименьшее ожидаемое количество, необходимое для работы; в случае с 50 параллельными пробирками предельным является отношение 200 : 1. Примеры использования метода НВЧ с одиночным разведением даны в приложении В, таблицы В.1 – В.4.

10.5.3.2 Система множественных разведений

Если концентрация микроорганизмов в пробе неизвестна или предполагается значительный разброс ее значений, может потребоваться засевать серии пробирок несколькими разведениями. Высевают достаточное количество разведений, чтобы гарантировать наличие в системе как положительных, так и отрицательных результатов. Количество разведений зависит также от метода расчетов, используемого при оценке значения НВЧ. Если требуется использовать таблицы, то необходимо располагать результатами для трех разведений, а конфигурация системы должна быть ограничена возможностями, предусмотренными в таблицах. При использовании компьютерных программ количество разведений и параллельных пробирок не ограничивается.

10.5.3.3 Симметричная система разведений

В наиболее широко применяемой симметричной системе НВЧ используются три или пять параллельных пробирок на разведение. Прецизионность, которую обеспечивает такая система, стремительно падает с уменьшением числа пробирок на разведение. Результаты, полученные с использованием трех пробирок, едва ли могут рассматриваться как нечто большее, чем указание на порядок величины концентрации. Если нужно получить более высокую прецизионность, рекомендуется выбрать пять или более параллельных пробирок. Примеры использования метода НВЧ с тремя и пятью параллельными пробирками даны в приложении В, таблицах В.5 и В.7 соответственно.

10.5.3.4 Асимметричная система разведений

В асимметричных системах различным уровням разведения соответствует неодинаковое число пробирок. Такие системы следует использовать только для определения количества микроорганизмов в пределах хорошо известного диапазона. Примеры см. в ISO 8199.

10.5.4 Инкубирование

Засеянные пробирки, колбы или флаконы помещают в термостат или в водяную баню. Инкубирование на многоячечных планшетах проводят в термостате.

Поскольку продолжительность и значение температуры инкубирования находятся в зависимости от искомого вида микроорганизмов или группы микроорганизмов, их выбирают после определения конкретного стандартного метода.

Для некоторых видов микроорганизмов может понадобиться инкубирование в два этапа и (или) дополнительный этап подтверждения.

10.5.5 Интерпретация результатов

Критерии различения положительных и отрицательных результатов варьируются в зависимости от каждого вида микроорганизмов или группы микроорганизмов и определяются в соответствующих

стандартах. В соответствии с данными критериями выполняют подсчет и документирование положительных результатов, которые были получены на всех навесках пробы.

10.5.6 Определение значений НВЧ

Существуют три различных способа определения значения НВЧ: расчет по математическим формулам, сверка с таблицами НВЧ или использование специальных компьютерных программ. Эти три способа, описанные ниже, являются эквивалентными при условии, что в основу их положены одни и те же статистические принципы.

10.5.6.1 Математические формулы

10.5.6.1.1 Приближенная формула для всех случаев

Приближенные значения НВЧ для произвольного количества разведений и параллельных пробирок получают с использованием следующего уравнения (заимствованного из [36]):

$$MPN = \frac{Z_p \times m_r}{\sqrt{m_s \times m_t}},$$

где Z_p – количество положительных пробирок;

m_r – эталонная масса пробы, г;

m_s – общая масса пробы во всех пробирках с отрицательной реакцией, г;

m_t – общая масса во всех пробирках , г.

НВЧ выражается в количестве на эталонную массу пробы, г (обычно 1 г, иногда 100 г).

10.5.6.1.2 «Точное» решение для одной серии пробирок

Значение НВЧ для одной серии пробирок выводится по формуле

$$MPN = \frac{m_r}{m_m} \ln\left[\frac{n}{n - z_p}\right],$$

где m_r – эталонная масса пробы, г;

m_m – масса пробы в каждой пробирке серии, г;

ln – натуральный логарифм;

n – количество пробирок в серии;

z_p – количество пробирок с положительной реакцией.

10.5.6.1.3 Оценка прецизионности для испытаний с одиночным разведением

Границы 95%-ного доверительного интервала для оценки НВЧ могут быть приблизительно рассчитаны с использованием следующей формулы

$$x = \frac{m_r}{m_m} \ln\left[\frac{n}{z_n \pm 2\sqrt{\frac{z(n - z_n)}{n}}}\right],$$

где x – верхний или нижний предел 95%-ного доверительного интервала;

m_r – эталонная масса пробы, г;

m_m – масса пробы в каждой пробирке серии, г;

ln – натуральный логарифм;

n – количество пробирок в серии;

z_n – количество пробирок с отрицательной реакцией.

Положительный знак соответствует нижнему пределу, а отрицательный – верхнему пределу. Аппроксимация здесь будет не очень качественной в случае, если большинство пробирок окажутся отрицательными (стерильными), однако будет увеличиваться с возрастанием доли положительных пробирок.

10.5.6.1.4 Оценка прецизионности для симметричных испытаний с несколькими разведениями

$\log_{10}$ стандартной неопределенности для симметричной системы НВЧ с несколькими разведениями можно получить с помощью аппроксимирующего уравнения Кочрена [28]:

$$SE = 0{,}58\sqrt{\frac{\log_{10} f}{n}},$$

где *SE* – среднеквадратическая погрешность $\log_{10}$ НВЧ;

f – коэффициент, отличающий последовательные разведения (как правило, 10);

n – количество пробирок, приходящихся на разведение.

Верхний и нижний пределы 95%-ного доверительного интервала могут быть аппроксимированы соответственно путем умножения и деления оценки MPN на антилогарифм 2 × SE. Для данного способа расчетов характерно завышение верхнего предела доверительного интервала.

10.5.6.2 Таблицы НВЧ

10.5.6.2.1 Таблицы для систем одиночных разведений

В таблицах В.1 – В.4 (приложение В) даны значения НВЧ и 95%-ных доверительных интервалов на навеску для 10, 15, 20 и 25 параллельных пробирок [в каждую пробирку было высеяно одно и то же (одиночное) разведение].

Для выражения выхода применительно к эталонной массе пробы (или объему – для жидких образцов) НВЧ и значения пределов 95%-ного доверительного интервала умножают на отношение эталонной массы к массе навески. Значение логарифмической стандартной неопределенности не перемножают. Эталонная масса в микробиологии пищевых продуктов обычно составляет 1 г. Масса навески соответствует имеющемуся количеству пробы (в граммах) в объеме, используемом для высева в пробирки, например 0,1 г, если используется 1 мг гомогенизированной пробы в концентрации 10^{-1}.

Пример – (См. [30]).

Двадцать пробирок с двойной концентрацией бульона были засеяны аликвотами по 5 мл десятикратно разведенной пробы (0,1 г/мл). После инкубирования 16 пробирок показали видимый рост колоний. Какова была наиболее вероятная плотность бактерий (организмов на грамм) в пробе? Таблица В.3 дает 1,61 как наиболее вероятное число организмов на пробирку с нижним пределом 95%-ного доверительного интервала 0,93 и верхним пределом 95%-ного доверительного интервала 2,77.

В каждую пробирку была добавлена навеска объемом 5 мл, что соответствует 0,5 г пробы. Таким образом, наиболее вероятное число организмов в 1 г пробы рассчитывается следующим образом:

$$MPN = \frac{1,61}{0,5} \text{ на грамм} = 3,2 \text{ на грамм}$$

с 95%-ным доверительным интервалом

$$\text{от нижнего предела 95%-ного доверительного интервала} = \frac{0,93}{0,5} \text{ на грамм} = 1,9 \text{ на грамм;}$$

$$\text{до верхнего предела 95%-ного доверительного интервала} = \frac{2,77}{0,5} \text{ на грамм} = 5,5 \text{ на грамм.}$$

10.5.6.2.2 Таблицы для систем множественных разведений: три последовательных разведения

В симметричных системах обычной практикой является использование трех последовательных разведений с тремя (таблица В.5) или пятью (таблица В.7) повторениями. Количество положительных результатов для каждого набора пробирок фиксируют и находят в таблице НВЧ для применяемой системы посева наиболее вероятное число микроорганизмов, присутствующих в эталонном объеме пробы.

Некоторые комбинации положительных пробирок встречаются чаще, чем другие. Например, комбинация положительных результатов 0, 0, 3 гораздо менее вероятна, чем комбинация 3, 2, 1. В целях количественной оценки такой вероятности всем комбинациям положительных результатов были приписаны категории в диапазоне чисел от 0 до 3. Результат, относящийся к категории 1, представляет собой результат с высокой долей вероятности, тогда как результат категории 3 является редким и его может быть трудно воспроизвести. Наихудший случай представляют результаты категории 0; к ним следует относиться с большой осторожностью. Предположив, что результаты анализа были верны, можно ожидать, что 95 % наблюдаемых комбинаций попадут в категорию 1, 4 % – в категорию 2, 0,9 % – в категорию 3 и только 0,1 % – в категорию 0. Более подробное описание категорий см. в таблице В.6.

В случаях, когда количество выполненных разведений более трех, выбор правильного сочетания трех последовательных разведений не всегда очевиден. Впрочем, это легко сделать, если зафиксировать все возможные комбинации положительных пробирок и подобрать соответствующую категорию в таблице В.5.

Затем действуют в соответствии со следующими правилами:

1) выбирают комбинацию трех последовательных разведений, соответствующую категории 1, для получения индекса НВЧ. Если 1-й категории соответствуют несколько комбинаций, выбирают ту из них, которая имеет наибольшее количество положительных пробирок;

2) если комбинации, относимые к категории 1, отсутствуют, используют комбинацию категории 2. Если 2-й категории соответствуют несколько комбинаций, выбирают ту из них, которая имеет наибольшее количество положительных пробирок;

3) если комбинации, относимые к категории 2, отсутствуют, используют комбинацию категории 3. Если 3-й категории соответствуют несколько комбинаций, выбирают ту из них, которая имеет наибольшее количество положительных пробирок.

Несколько примеров показаны в таблице 1.

Таблица 1 – Примеры выбора положительных результатов для расчета НВЧ

Проба	Количество положительных пробирок среди трех засеянных пробирок при следующих количествах пробы, высеянных в пробирку [a]					НВЧ [b]	
						Жидкие продукты ($мл^{-1}$)	Прочие продукты ($г^{-1}$)
	Жидкие продукты 10 мл	1 мл	10^{-1} мл	10^{-2} мл	10^{-3} мл		
	Прочие продукты 1 г	10^{-1} г	10^{-2} г	10^{-3} г	10^{-4} г		
1	3	3	2	1	0	1,1 × 101	1,1 × 102
2	3	3	3	0		2,4 × 101	2,4 × 102
3	2	2	1	1	0	7,4	7,4 × 101
4	3	3	0	0	0	2,4	2,4 × 101
5	2	2	0	1	0	2,1 × 10^{-1}	2,1

[a] Выбранные комбинации выделены подчеркиванием.
[b] Рассчитано с использованием индекса НВЧ (см. таблицу В.5).

10.5.6.3 Компьютерные программы

Наиболее универсальные компьютерные программы не устанавливают никаких ограничений по количеству разведений и параллельных пробирок либо по симметричности систем НВЧ. К ним относится MPN Assay Analyzer – бесплатная программа, разработанная на основе предыдущей версии программного обеспечения (см. [29]).

10.5.7 Выражение результатов

Используя индекс НВЧ, найденный в таблице В.5 [в соответствии с комбинацией трех (или пяти) выбранных последовательных разведений], определяют наиболее вероятное число микроорганизмов в эталонном объеме пробы.

Результаты выражают как наиболее вероятное количество микроорганизмов (или определенных групп микроорганизмов) на грамм или миллилитр. Для различения между эталонной массой и объемом служат обозначения г и мл (например, 100 г или 100 мл).

11 Метод обнаружения (качественный метод)

11.1 Общие требования

Метод обнаружения – это метод, который определяет наличие или отсутствие конкретных микроорганизмов в заданном количестве продукта.

11.2 Принцип

Если в специализированных стандартах не установлено иное, некоторое количество продукта P для исследования смешивают (для жидких продуктов) или гомогенизируют (для прочих продуктов) с 9 × P мл или 9 × P г элективной и (или) селективной жидкой среды.

Чтобы способствовать выделению специфических микроорганизмов, находящихся в малых количествах в продуктах питания, пробы обычно предварительно обогащают в неселективном бульоне, после этого производятся селективное обогащение и изоляция на селективной/дифференциальной агаровой среде. Использование двух различных бульонов для обогащения, а также двух или более селективных агаровых сред повышает чувствительность метода.

После инкубирования полученную культуру с помощью бактериологической петли распределяют по поверхности селективной агаровой среды таким образом, чтобы получить изолированные колонии. Если не указано иное, инкубированные обогатительные бульоны можно замораживать только при условии, что была проведена оценка влияния замораживания на получаемые результаты, а также что это действие будет отчетливо отражено в протоколе испытаний.

Некоторое количество полученных после инкубирования колоний (обычно пять на чашку Петри с агаризованной средой) подвергают идентификации с использованием соответствующих методов подтверждения.

Выбор колоний для подтверждения должен охватывать репрезентативные типы предполагаемых колоний.

11.3 Измерение неопределенности

Вопросы оценки неопределенности измерений для способов качественного определения рассматриваются подкомитетом ISO/TC 34/SC 9.

12 Методы подтверждения

12.1 Общие требования

Для биохимического и серологического подтверждения используют только чистые культуры.

Проведение контрольных испытаний для целей подтверждения рассматривается в специализированных стандартах. В качестве альтернативы биохимическим испытаниям, описанным в данных стандартах, при выполнении указанных условий могут быть использованы методы подтверждения, описанные в настоящем разделе (биохимические наборы, нуклеиновые зонды), если иное не установлено в специализированных стандартах.

12.2 Приготовление чистой культуры

Приготовление чистых культур начинают с выбора отдельной колонии в (на) агаровой среде. Затем высевают выбранную культуру на неселективную агаровую среду. После инкубирования выбирают одну хорошо изолированную колонию для дальнейших испытаний на подтверждение. Повторяют описанные действия, если потребуется.

По возможности испытания на подтверждения должны проводиться с использованием клеток, взятых из одной колонии. Если клеточного материала в одной колонии недостаточно, он должен быть предварительно пересеян в жидкую среду или на скошенную агаровую среду, после чего субкультура может быть использована для проведения испытаний.

12.3 Окрашивание по Граму (модифицированный метод Хаккера)

12.3.1 Общие требования

Этот способ окрашивания бактериальных клеток позволяет описать морфологию бактерий и классифицировать их на две группы на основании способности приобретать в условиях испытания фиолетовое окрашивание с кристаллическим фиолетовым. Это разделение связано в основном с различиями в структуре клеточных стенок обеих групп и коррелирует с другими основными различиями между этими группами.

Приемлемой альтернативой окрашиванию по Граму является использование 3%-ного раствора едкого калия (KOH). Набрав полную петлю бактериальной культуры, ее разводят в двух каплях раствора KOH. После попадания в раствор грамотрицательных бактерий он в течение 30 с приобретает значительную вязкость и становится похожим на слизь, при этом часть смеси тянется за петлей.

Существует несколько способов окрашивания по Граму, но во всех случаях соблюдается последовательность действий, описанная ниже.

12.3.2 Растворы

12.3.2.1 Общие требования

Могут быть использованы серийно выпускаемые растворы.

В этом случае необходимо учитывать рекомендации изготовителя.

12.3.2.2 Раствор кристаллического фиолетового

12.3.2.2.1 Состав

Кристаллический фиолетовый – 2,0 г.

Этанол (95 %) – 20 мл.

Оксалат аммония ($C_2H_8N_2O_4$) – 0,8 г.

Вода – 80 мл.

12.3.2.2.2 Приготовление

Растворяют кристаллический фиолетовый в этаноле, а оксалат аммония в дистиллированной воде. Смешивают два раствора и оставляют смесь на 24 ч перед использованием.

12.3.2.3 Раствор иода

12.3.2.3.1 Состав

Иод – 1,0 г.
Иодид калия (KI) – 2,0 г.
Вода – 100 мл.

12.3.2.3.2 Приготовление

Растворяют иодид калия в 10 мл воды и добавляют порциями иод. После растворения объем раствора доводят до 100 мл в мерной колбе.

12.3.2.4 Раствор сафранина

12.3.2.4.1 Состав

Сафранин – 0,25 г.
Этанол (95 %) – 10 мл.
Вода – 100 мл.

12.3.2.4.2 Приготовление

Растворяют сафранин в этаноле, затем смешивают с дистиллированной водой.

12.3.3 Техника окрашивания

После фиксации пламенем на предметном стекле бактериальной пленки из культуры, выращенной в течение 18 – 24 ч, или бульона с признаками роста микроорганизмов ее заливают раствором кристаллическим фиолетовым и оставляют на 1 мин для протекания реакции.

Держа стекло в наклонном положении, его осторожно промывают водой в течение нескольких секунд.

Наносят на стекло раствор иода и оставляют на 1 мин для протекания реакции.

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

Стекло в наклонном положении осторожно промывают водой для удаления этанола. Наносят на стекло раствор сафранина и оставляют на 10 с. Осторожно промывают стекло в наклонном положении водой.

Высушивают стекло.

12.3.4 Интерпретация результатов

Стекло просматривают под микроскопом, используя для этого мощный световой 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 целей идентификации

Для идентификации изолированных колоний могут быть использованы доступные биохимические наборы.

Проверяют пригодность наборов для выполняемых задач в соответствии с результатами исследований, опубликованными в международной научной литературе [4)]. Такая проверка особенно важна, если изготовитель не располагает данными валидации применительно к этим наборам.

Лаборатория должна получить контрольный сертификат на каждую партию с указанием испытательных штаммов.

Изготовитель также должен определить контрольные штаммы, которые лаборатория может использовать для проверки сохранения наборами их характеристик.

В наборы должны входить как минимум средства для проведения биохимических испытаний, описанных в специализированных стандартах или подтвержденных другими испытаниями.

[4)] Запросы на получение информации направляют в национальные, региональные или международные справочные центры, определенные для каждого микроорганизма.

12.5 Использование нуклеиновых зондов для целей идентификации

Для идентификации изолированных колоний могут быть использованы доступные в настоящее время нуклеиновые зонды.

Тем не менее следует убедиться, что нуклеиновые зонды, используемые для подтверждения, пригодны для выполнения этой задачи в соответствии с результатами исследований, опубликованными в международной научной литературе, желательно посвященной вопросам микробиологии пищевых продуктов (см., например, [23]). Такая проверка особенно важна, если изготовитель не располагает данными валидации применительно к этим наборам.

Лаборатория должна получить контрольный сертификат на каждую партию с указанием испытательных штаммов.

Изготовитель также должен определить контрольные штаммы, которые лаборатория может использовать для проверки сохранения зондом его характеристик.

12.6 Серологические методы

12.6.1 Общие требования

Если требуется серологическое подтверждение, его выполняют после биохимической идентификации изолированных колоний.

12.6.2 Реакция агглютинации на предметном стекле

Реакции «антиген – антитело» приводят к слипанию бактериальных клеток и образованию ими хлопьевидной массы или плотных гранул. В случае с бактериями из семейства Enterobacteriaceae реакция между Н-антигеном (т. е. жгутиковым) и его гомологической антисывороткой вызывает склеивание в хлопья, тогда как реакция с участием С-антигена (т. е. соматического) вызывает склеивание в более плотные комки, гранулы.

Перед агглютинацией с антисывороткой необходимо провести испытания для установления того, происходит ли агглютинация бактериальных клеток в растворе хлорида натрия [3 % (по массе)]. Если бактериальные клетки склеиваются, значит, штамм способен к аутоагглютинации и он не должен подвергаться агглютинации с использованием антисыворотки.

Серийно выпускаемые антисыворотки делятся на два типа: поливалентные антисыворотки, которые реагируют с микроорганизмами определенного вида или группами сероваров и подходят для целей предварительного скрининга, и моноклональные антитела, использование которых обеспечивает идентификацию конкретных сероваров.

Лаборатория должна получить контрольный сертификат для каждой партии антисыворотки с указанием испытательных штаммов.

Проверяют пригодность испытаний с реакцией на предметном стекле для выполняемых задач в соответствии с результатами исследований, опубликованных в международной научной литературе, желательно посвященной вопросам микробиологии пищевых продуктов [5)].

При использовании реактивов необходимо применять соответствующие средства положительного и отрицательного контроля.

12.6.3 Реакция латекс-агглютинации

Существует более скоростной метод, материалы для которого выпускаются серийно и включают в себя частицы латекса, покрытые группоспецифическими антителами (например, *Escherichia coli* O157, см. специализированный стандарт ISO 16654, или *Staphylococcus aureus*, см. ISO 6888). Антиген в экстракте испытывается на воздействие ряда реактивов на латексе.

Проверяют пригодность испытаний с реакцией латекс-агглютинации для выполняемых задач в соответствии с результатами исследований, опубликованных в международной научной литературе, желательно посвященной вопросам микробиологии пищевых продуктов [5)].

Лаборатория должна получить контрольный сертификат для каждой партии с указанием испытательных штаммов.

При использовании реактивов необходимо применять соответствующие средства положительного и отрицательного контроля.

[5)] Запросы на получение информации направляют в национальные, региональные или международные справочные центры, определенные для каждого микроорганизма.

13 Протокол испытаний

В протоколе испытаний должны быть указаны: используемый метод, температура инкубирования, если требуется, и полученные результаты. В нем должны быть также отражены все особенности рабочего процесса, не представленные в настоящем стандарте, и другие, рассматриваемые как факультативные, наряду с подробными сведениями о любых происшествиях, которые могли оказать влияние на результаты испытаний.

Кроме того, в протоколе испытаний указывают, должны ли последующие испытания выполняться эталонной лабораторией и, если такие испытания проводились, каковы были результаты этих испытаний.

Протокол испытаний должен содержать в себе всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы. Целесообразно также включать в него информацию для интерпретации результатов испытаний.

При необходимости в протоколе указывают значение неопределенности измерения, установленное в соответствии с требованиями ISO/TS 19036.

14 Валидация микробиологических методов

14.1 Валидация эталонных методов

Вопросы валидации эталонных методов рассматриваются подкомитетом ISO/TC 34/SC 9.

14.2 Валидация альтернативных методов

Сведения об использовании технического протокола для валидации альтернативных методов в сравнении с эталонными методами см. в ISO 16140.

14.3 Валидация внутренних методов лаборатории

Вопросы валидации внутренних методов рассматриваются подкомитетом ISO/TC 34/SC 9.

15 Обеспечение качества результатов (управление качеством работ)

15.1 Внутреннее управление качеством

15.1.1 Внутреннее управление качеством включает в себя все процедуры, применяемые лабораторией для целей непрерывной оценки своей работы. Основной задачей является обеспечение непротиворечивости результатов текущего контроля и их соответствия четко определенным критериям.

15.1.2 Программа периодических проверок необходима для подтверждения того, что изменчивость (применительно к испытателям, оборудованию или материалам) находится под контролем. Должны быть охвачены все виды испытаний, входящие в область деятельности лаборатории.

Программа должна включать в себя:

– использование проб с искусственно внесенными микроорганизмами, с различными уровнями заражения, включая целевую и фоновую флору;

– использование проб с искусственным и (или) естественным заражением из некоторого диапазона матриц;

– использование стандартных образцов (включая материалы для схем проверки на качество проведения испытаний);

– повторные испытания;

– повторную оценку результатов испытаний.

Периодичность таких проверок зависит от природы испытаний, проводимых лабораторией, и частоты, с которой проводятся эти испытания.

Рекомендуется, чтобы по возможности при испытаниях предусматривались средства для контроля рабочих показателей.

15.1.3 Возможны случаи, когда отдельные виды испытаний лаборатория проводит очень редко. Признано, что в такой ситуации использовать программу непрерывного внутреннего контроля качества нецелесообразно и что более оправданным здесь является подтверждение удовлетворительных рабочих показателей с применением такой схемы, которая реализуется параллельно с испытаниями.

15.2 Эталонные штаммы

Сведения о хранении эталонных штаммов см. в ISO 11133.

15.3 Внешняя оценка качества (проведение проверок на качество проведения испытаний)

Лаборатории должны регулярно принимать участие в программах проверки на качество проведения испытаний в своей области деятельности. Предпочтение должно отдаваться программам проверки на качество проведения испытаний с использованием соответствующих матриц.

Лаборатории должны прибегать к внешней оценке качества не только для оценки своей систематической погрешности, но и для проверки действенности своей системы менеджмента качества в целом.

Приложение А
(справочное)

Характеристики некоторых дезинфицирующих средств

Таблица А.1 – Характеристики некоторых дезинфицирующих средств

Дезинфицирующие средства	Активность в отношении							Неактивность в присутствии					Токсичность для		
	грибков	бактерий		микробактерий	спор	липидных вирусов	нелипидных вирусов	белков	природных материалов	синтетических материалов	жесткой воды	моющих средств	кожи	глаз	легких
		грам-положительных	грам-отрицательных												
Гипохлориты	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
Спирты	–	+++	+++	+++	–	+	V	+	+	+	+	–		+	
Формальдегид	+++	+++	+++	+++	+++ [a]	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Глутаральдегид	+++	+++	+++	+++	+++ [b]	+	+	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++
Иодофоры	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	–

+++ – высокая;
++ – средняя;
+ – незначительная;
– – отсутствует;
V – зависит от разновидности вируса;
C – катионоактивных;
A – анионоактивных;
NA – не применимо.

[a] При температуре выше 40 °C.
[b] При температуре 20 °C.

Источник: [17].

Приложение В
(обязательное)

Определение наиболее вероятного числа (НВЧ)

Таблица В.1 – Значения НВЧ для навески и пределы 95%-ного доверительного интервала при использовании серии из 10 пробирок, рассчитанные в соответствии с указаниями [29]

Количество положительных пробирок	Серия из 10 пробирок			
	НВЧ	Стандартная неопределенность $\log_{10}$ НВЧ	Пределы 95%-ного доверительного интервала	
			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 В.2 – Значения НВЧ для навески и пределы 95%-ного доверительного интервала при использовании серии из 15 пробирок, рассчитанные в соответствии с указаниями [29]

Количество положительных пробирок	Серия из 15 пробирок			
	НВЧ	Стандартная неопределенность $\log_{10}$ НВЧ	Пределы 95%-ного доверительного интервала	
			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 В.3 – Значения НВЧ для навески и пределы 95%-ного доверительного интервала при использовании серии из 20 пробирок, рассчитанные в соответствии с указаниями [29]

Количество положительных пробирок	Серия из 20 пробирок			
	НВЧ	Стандартная неопределенность $\log_{10}$ НВЧ	Пределы 95%-ного доверительного интервала	
			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
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 В.4 – Значения НВЧ для навески и пределы 95%-ного доверительного интервала при использовании серии из 25 пробирок, рассчитанные в соответствии с указаниями [29]

Количество положительных пробирок	Серия из 25 пробирок			
	НВЧ	Стандартная неопределенность $\log_{10}$ НВЧ	Пределы 95%-ного доверительного интервала	
			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 В.5 – Индексы НВЧ и пределы 95%-ного доверительного интервала при использовании трех навесок по 1 г (мл), трех по 0,1 г (мл) и трех по 0,01 г (мл)

Количество положительных пробирок			Индекс НВЧ [a]	Категория [b]	Пределы доверительного интервала (95 %) [a, c]	
					Нижний предел	Верхний предел
0	0	0	< 0,30		0,00	0,94
0	0	1	0,30	3	0,01	0,95
0	1	0	0,30	2	0,01	1
0	1	1	0,61	0	0,12	1,7
0	2	0	0,62	3	0,12	1,7
0	3	0	0,94	0	0,35	3,5
1	0	0	0,36	1	0,02	1,7
1	0	1	0,72	2	0,12	1,7
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5
1	1	0	0,74	1	0,13	2
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8
2	0	0	0,92	1	0,15	3,5
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5
2	0	2	2,0	0	0,5	3,8
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4
2	2	0	2,1	1	0,5	4
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9
3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9,3	1	1,8	36
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	> 110			

[a] Источник: [27].
[b] См. таблицу В.6.
[c] Пределы доверительного интервала, представленные в настоящей таблице, предназначены только для того, чтобы дать некоторые представления о влиянии статистических отклонений на результаты испытаний. Обычно имеют место и другие источники отклонений, которые иногда могут быть даже более значительными.

Таблица В.6 – Классификация результатов

Категория [a]	Определение
1	Если количество бактерий в пробе соответствует найденному НВЧ, результат относится к получаемым с наибольшей вероятностью. Возможность получения результата менее вероятного, чем наименее вероятный из результатов данной категории, соответствует не более 5 %
2	Если количество бактерий в пробе соответствует найденному НВЧ, результат относится к получаемым с меньшей вероятностью, чем даже в случае наименее вероятного из результатов категории 1, однако возможность получения результата менее вероятного, чем наименее вероятный из результатов данной категории, соответствует не более чем 1
3	Если количество бактерий в пробе соответствует найденному НВЧ, результат относится к получаемым с меньшей вероятностью, чем даже в случае наименее вероятного из результатов категории 2, однако возможность получения результата менее вероятного, чем наименее вероятный из результатов данной категории, соответствует не более чем 0,1 %
0	Если количество бактерий в пробе соответствует найденному НВЧ, результат относится к получаемым с меньшей вероятностью, чем даже в случае наименее вероятного из результатов категории 3. В данной категории возможность получения безошибочного результата соответствует 0,1 %.
[a] До начала испытаний необходимо оценить приемлемость той или иной категории, например 1, 1 и 2 или даже 1, 2 и 3 согласно таблицам В.1. и В.2. Если на основе результатов принимается достаточно важное решение, следует признавать только результаты категории 1 или, самое большее, категорий 1 и 2. К результатам категории 0 следует относиться с большой осторожностью.	

Таблица В.7 – Значения НВЧ на грамм пробы и пределы 95%-ного доверительного интервала (если используются 5 навесок по 1 г, пять по 0,1 г и пять по 0,01 г)

Количество пробирок, дающих положительную реакцию			НВЧ (на грамм)	Пределы 95%-ного доверительного интервала	
5 по 1 г	5 по 0,1 г	5 по 0,01 г		Нижний	Верхний
0	0	0	< 0,2	< 0,1	0,7
0	1	0	0,2	< 0,1	0,7
0	2	0	0,4	< 0,1	1,1
1	0	0	0,2	< 0,1	0,7
1	0	1	0,4	< 0,1	1,1
1	1	0	0,4	< 0,1	1,1
1	1	1	0,6	< 0,1	1,5
2	0	0	0,5	< 0,1	1,3
2	0	1	0,7	0,1	1,7
2	1	0	0,7	0,1	1,7
2	1	1	0,9	0,2	2,1
2	2	0	0,9	0,2	2,1
2	3	0	1,2	0,3	2,8
3	0	0	0,8	0,1	1,9
3	0	1	1,1	0,2	2,5
3	1	0	1,1	0,2	2,5
3	1	1	1,4	0,4	3,4
3	2	0	1,4	0,4	3,4
3	2	1	1,7	0,5	4,6
3	3	0	1,7	0,5	4,6

Окончание таблицы В.7

Количество пробирок, дающих положительную реакцию			НВЧ (на грамм)	Пределы 95%-ного доверительного интервала	
5 по 1 г	5 по 0,1 г	5 по 0,01 г		Нижний	Верхний
4	0	0	1,3	0,3	3,1
4	0	1	1,7	0,5	4,6
4	1	0	1,7	0,5	4,6
4	1	1	2,1	0,7	6,3
4	1	2	2,6	0,9	7,8
4	2	0	2,2	0,7	6,7
4	2	1	2,6	0,9	7,8
4	3	0	2,7	0,9	8
4	3	1	3,3	1,1	9,3
4	4	0	3,4	1,2	9,3
5	0	0	2,3	0,7	7
5	0	1	3,1	1,1	8,9
5	0	2	4,3	1,5	11
5	1	0	3,3	1,1	9,3
5	1	1	4,6	1,6	12
5	1	2	6,3	2,1	15
5	2	0	4,9	1,7	13
5	2	1	7	2,3	17
5	2	2	9,4	2,8	22
5	3	0	7,9	2,5	19
5	3	1	11	3,1	25
5	3	2	14	3,7	34
5	3	3	18	4,4	50
5	4	0	13	3,5	30
5	4	1	17	4,3	49
5	4	2	22	5,7	70
5	4	3	28	9	85
5	4	4	35	12	100
5	5	0	24	6,8	75
5	5	1	35	12	100
5	5	2	54	18	140
5	5	3	92	30	320
5	5	4	160	64	580
5	5	5	> 180	–	–

Библиография

[1] Bell, C. Neaves, P. and Williams, A.P. Food microbiology and laboratory practice, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK (2005) (Микробиология пищевых продуктов и лабораторная практика)

[2] ISO 9001, Quality management systems – Requirements (Системы менеджмента качества. Требования)

[3] EA-Guidelines for the use of computers and computer systems in accredited laboratories, European cooperation for Accreditation (1998) (Руководящие указания EA по использованию компьютеров и компьютерных систем в аккредитованных лабораториях)

[4] EA-4/10, Accreditation for microbiological laboratories, European cooperation for Accreditation (2002) (Аккредитация микробиологических лабораторий)

[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) (Программные требования по микробиологии, основанные на документе FLAWG «Критерии аккредитации в США для лабораторий, проводящих микробиологические испытания пищевых продуктов»)

[6] AS 1766, Australian standard methods for the microbiological examination of food – Part 1: General techniques and procedures update (Эталонные методы микробиологических исследований пищевых продуктов в Австралии. Часть 1. Обновленные общие методики и процедуры)

[7] Buttiaux, R., Beerens, H. and Tacquet, A. Manuel de techniques bacteriologiques, Editions Medicales Flammarion (4th edn.) (Руководство по методам бактериологических исследований)

[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 (Технический комитет APHA по методам микробиологических исследований пищевых продуктов. Компендиум по методам микробиологических исследований пищевых продуктов, 2-я редакция, ред. Спек, М. Л.)

[9] Cruickshank et al., Medical microbiology, Vol. 2, 12th edn., Churchill-Livingstone, Edinburgh (1975) (Медицинская микробиология, т. 2, 12-е издание)

[10] D'Aoust, J.Y. Psychrotrophy and foodborne Salmonella. Int. J. Food. Microbiol. 1991, 13, pp. 207-16 (Психротрофия и Salmonella в пищевых продуктах)

[11] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and McDonald, C. Recovery of Salmonella spp. from refrigerated preenrichment cultures of dry food composites, J. AOAC Int. 1995, 78, pp. 1322-7 (Выделение Salmonella spp. из охлажденных необогащенных культур в сухих пищевых смесях)

[12] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Greco, P. Detection of Salmonella in dry foods using refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures: summary of collaborative study. J. AOAC. Int. 1994, 77, pp. 1490-1 (Определение Salmonella в сухих пищевых продуктах с использованием охлажденных необогащенных и обогащенных культур: обобщение результатов совместного исследования)

[13] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Greco, P. Detection of Salmonella in dry foods using refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures – Interlaboratory study, J. AOAC. Int. 1993, 76, pp. 814-21 (Определение Salmonella в сухих пищевых продуктах с использованием охлажденных необогащенных и обогащенных культур. Результаты межлабораторного исследования)

[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 (Руководство по выполнению микробиологического анализа пищи и пищевых продуктов («Надлежащая лабораторная практика»)

[16] Muir, G.D., ed. Hazards in the chemical laboratory, Royal Institute of Chemistry, London (1971) (Угрозы в химической лаборатории)

[17] Laboratory biosafety manual, WHO, Geneva, 1993 (Руководство по биологической безопасности в лаборатории)

[18] Lightfoot, N.F., Maier, E.A. (eds). Microbiological analysis of food and water – Guidelines for quality assurance. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1998) (Микробиологический анализ пищи и воды. Руководящие указания по обеспечению качества)

[19] Harrigan, W.F. and McCance, M.E. Laboratory methods in food and dairy microbiology, Academic Press (1976) Laboratory methods in food and dairy microbiology, Academic Press (1976) (Лабораторные методы в микробиологии пищи и молочных продуктов)

[20] Laboratory safety at the Centers for Disease Control (CDC), NHEW Publication No. CDC 79-8118, Atlanta, 1979 (Лабораторная безопасность в центрах по контролю заболеваний (CDC)

[21] Laboratory safety at the Centers for Disease Control, US Dept of Health, Education and Welfare (Public Health Service), Atlanta, 1979 (Лабораторная безопасность в центрах по контролю заболеваний, Министерство здравоохранения, просвещения и социального обеспечения США)

[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 2006 (1981) (Руководство по методам общей бактериологии)

[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 (Об усовершенствовании подсчета Listeria monocytogenes в лососине холодного копчения)

[24] Microbiological testing laboratory accommodation guidelines, National Association of Testing Authorities, Australia (Руководящие указания по оборудованию микробиологических испытательных лабораторий)

[25] Microorganisms in foods – 1: Their significance and methods of enumeration, ICMSF, University of Toronto Press (1968 update) (Микроорганизмы в продуктах питания. 1: Значение и методы подсчета микроорганизмов)

[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) (Безопасность в микробиологии. Общество прикладной бактериологии, техническая серия 1 и 6)

[27] De Man, J.C. MPN tables (corrected), Eur. J. Appl. Biotechnol. 1983, 17, pp. 301-5 [Таблицы НВЧ (исправленные)]

[28] Cochran, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the «Most Probable Number». Biometrics 1950, 6, pp. 105-16 (Определение плотности популяции бактерий по методу наиболее вероятного числа)

[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 (Автоматический статистический анализ определения количества микроорганизмов при помощи серии разведений)

[30] Niemela, S. Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Report No. 1, 2nd edition (1983) (Статистическая оценка результатов количественных микробиологических исследований)

[31] Taylor, J. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series, J. Appl. Bacteriol. 1962, 25, pp. 54-61 (Определение количества бактерий с использованием десятичных разведений)

[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) (Руководство Берджи по определительной бактериологии, 9-е издание)

[33] Krieg, N.R. and Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology – Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984) (Руководство Берджи по систематической бактериологии. Том 1)

[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 (Руководство Берджи по систематической бактериологии. Том 2, 2-е издание)

[35] Kreger-van Rij, N.J.W. The yeasts – A taxonomic study, 3rd edn., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands (Дрожжи. Таксономическое исследование, 3-е издание)

[36] Thomas, H.A. Bacterial densities from fermentation tube tests, J. Am. Water Works Assoc. 1942, 34, pp. 572-6 (Значения бактериальной плотности по результатам испытаний с бродильной трубкой)

[37] ISO/IEC Guide 43-1 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficenciency testing schemes
(Проверка лабораторий на качество проведения испытаний посредством межлабораторных сличений. Часть 1. Разработка и реализация программ проверки на качество испытаний)

[38] ISO 6888 (all parts) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)
(Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета коагулазо-положительных стафилококков (Staphylococcus aureus и другие виды)

[39] ISO 9998 Water quality – Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality tests
(Качество воды. Практические методы оценки и контроля микробиологической среды для подсчета колоний при испытаниях качества воды)

[40] ISO/TR 13843 Water quality – Guidance on validation of microbiological methods
(Качество воды. Руководство по валидации микробиологических методов)

[41] ISO 14461-1 Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 1: Analyst performance assessment for colony counts
(Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 1. Оценка качества работы химиков-лаборантов, осуществляющих подсчет колоний)

[42] ISO 14461-2 Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps
(Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 2. Определение достоверности подсчетов колоний на параллельных пластинках и последующие стадии разбавления)

[43] ISO 16654 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157
(Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения Escherichia coli (кишечная палочка) O157)

[44] ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
(Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

[45] EN 12469 Biotechnology – Performance criteria for microbiological safety cabinets
(Биотехнология. Требования к характеристикам боксов, обеспечивающих микробиологическую безопасность)

[46] ISO 17604 — Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis
(Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Отбор проб из туш животных для микробиологического анализа)

[47] ISO 18593 — Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for sampling techniques from surfaces using contact plates and swab methods
(Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод отбора проб с поверхности с использованием контактных проб и мазков)

[48] ISO Guide 99:1996 — International vocabulary of basic and general terms in metrology
(Международный словарь основных и общих терминов в метрологии)

[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
(Вспомогательный документ по переходу от методики подсчета колоний с использованием двух пластинок на разведение к методике с использованием одной пластинки на разведение (пересмотр ISO 7218), июнь 2007 г., Мари Корню)

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 27.05.2010. Подписано в печать 19.07.2010. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 7,32 Уч.- изд. л. 4,69 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru