ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 7218— 2008

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ISO 7218:2007
Microbiology of foods and animal feed — General requirements and guide for microbiological research
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным учреждением «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Российской академии медицинских наук на основе русской версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. № 480-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 7218:2007 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство по микробиологическим исследованиям (ISO 7218:2007 «Microbiology of foods and animal feed — General requirements and guide for microbiological research»).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении С

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2011 г.

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2010
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2011

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Помещения . . . 2
3.1 Общие положения . . . 2
3.2 Условия безопасности . . . 2
3.3 Планирование лаборатории . . . 3
3.4 Участки лаборатории . . . 3
3.5 Расположение и оснащение помещений . . . 3
3.6 Чистка и дезинфекция . . . 4
4 Требования к персоналу . . . 5
4.1 Общие положения . . . 5
4.2 Квалификация . . . 5
4.3 Проверка квалификации персонала лаборатории . . . 5
4.4 Гигиена . . . 5
5 Аппаратура и оборудование . . . 5
6 Подготовка стеклянной посуды и других лабораторных материалов . . . 22
6.1 Подготовка . . . 22
6.2 Стерилизация/дезактивация . . . 22
6.3 Одноразовое оборудование и материалы . . . 22
6.4 Хранение чистой стеклянной посуды и других материалов . . . 22
6.5 Применение обеззараживания (деконтаминации) и дезинфекции . . . 23
6.6 Обработка отходов . . . 23
6.7 Мойка . . . 23
7 Приготовление и стерилизация питательных сред . . . 24
8 Лабораторные пробы . . . 24
8.1 Отбор проб . . . 24
8.2 Транспортирование . . . 24
8.3 Получение проб . . . 24
8.4 Хранение . . . 25
8.5 Проба (навеска) для анализа . . . 25
9 Экспертиза (исследование) . . . 25
9.1 Гигиенические меры предосторожности при проведении исследований . . . 25
9.2 Приготовление исходной суспензии и разведений . . . 26
10 Обработка результатов . . . 27
10.1 Общие положения . . . 27
10.2 Подсчет при использовании плотных питательных сред . . . 27
10.3 Обработка результатов, полученных на плотных средах . . . 29
10.4 Подсчет колоний дрожжей и плесеней . . . 34
10.5 Подсчет при использовании жидких сред . . . 34
11 Метод выявления (качественный метод) . . . 39
11.1 Общие положения . . . 39

11.2 Принцип . . . 39
11.3 Измерение неопределенности . . . 39
12 Метод идентификации (подтверждения) . . . 39
12.1 Общие положения . . . 39
12.2 Приготовление чистой культуры . . . 39
12.3 Окрашивание по Грамму (модифицированный метод Хаккера) . . . 39
12.4 Использование биохимических наборов для идентификации . . . 40
12.5 Применение нуклеиновых зондов для идентификации . . . 41
12.6 Серологические методы . . . 41
13 Протокол испытания . . . 42
14 Валидация (обоснованность) микробиологических методов . . . 42
14.1 Валидация (обоснованность) стандартных методов . . . 42
14.2 Валидация (обоснованность) альтернативных методов . . . 42
14.3 Валидация (обоснованность) собственных методов . . . 42
15 Обеспечение качества результатов/контроля качества исполнения . . . 42
15.1 Внутренний контроль качества . . . 42
15.2 Референс-штаммы (справочные и эталонные штаммы) . . . 42
15.3 Внешний контроль качества (оценка качества сторонней организацией) . . . 42
Приложение А (справочное) Свойства некоторых дезинфицирующих веществ . . . 43
Приложение В (справочное) Определение наиболее вероятного числа (НВЧ) . . . 44
Приложение С (справочное) Сведения о соответствии национальных стандартов Российской Федерации ссылочным международным стандартам . . . 50
Библиография . . . 51

Введение

При проведении микробиологических испытаний особенно важным является следующее:

- необходимо выделять и подсчитывать только те микроорганизмы, которые присутствуют в пробах;
- следует исключить загрязнение окружающей среды микроорганизмами.

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

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

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

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

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

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

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

Microbiology of foods and animal feed.
General requirements and guide for microbiological research

Дата введения — 2010—01—01

1 Область применения

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

- внедрение стандартов Технического комитета ИСО/ТК 34/SC9 или 34/SC 5 по обнаружению и подсчету микроорганизмов, здесь и далее называемых соответствующими «стандартами на конкретный метод испытания»;
- надлежащая лабораторная практика для микробиологических лабораторий, исследующих пищевые продукты (в задачи настоящего стандарта не входит их описание, для этого имеются специальные справочники);
- руководство по аккредитации микробиологических лабораторий (в настоящем стандарте описываются технические требования согласно приложению В стандарта ИСО 17025 для аккредитации микробиологических лабораторий национальными органами).

Требования настоящего стандарта отменяют и заменяют собой соответствующие требования существующих стандартов на конкретный метод испытания.

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

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

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

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

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты.

ИСО 835:2007 Посуда лабораторная стеклянная. Мерные градуированные пипетки

ИСО 6887-1:1999 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений

ИСО 6887-2:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила для приготовления мяса и мясных продуктов

ИСО 6887-3:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов

Издание официальное

ИСО 6887-4:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для приготовления продуктов, кроме молока и молочных продуктов

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

ИСО 8261:2001 Молоко и молочные продукты. Общие правила приготовления испытуемых проб, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований

ИСО 8655-1:2002 Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 1. Терминология, общие требования и рекомендации для пользователя

ИСО/ТУ 11133-1:2009 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 1. Общие правила по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории

ИСО/ТУ 11133-2:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие положения по приготовлению и производству питательных сред. Часть 2. Практические руководящие положения по определению эффективности питательных сред

ИСО 16140:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол для оценки альтернативных методов

ИСО 19036:2006 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство для оценки неопределенности измерения количественных показателей

ИСО 22174:2005 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Общие требования и определения

3 Помещения

3.1 Общие положения

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

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

3.2 Условия безопасности

Лабораторный проект должен содержать требования безопасности, которые будут зависеть от типа эпидемиологической опасности микроорганизма. По этому принципу микроорганизмы классифицируются на четыре категории риска:

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

Вероятность заражения таким микроорганизмом человека или животного мала.

- 3-я категория риска (группа патогенности) (умеренный риск для отдельного человека, низкий риск для общества).

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

- 2-я категория риска (группа патогенности) (высокий риск для индивидуума, низкий риск для общества).

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

1-я категория риска (группа патогенности) (высокий риск для индивидуума и для общества).

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

Представителей 3-й и 4-й групп патогенности микроорганизмов часто обозначают как непатогенные или условно патогенные виды микроорганизмов, а патогены 1-й и 2-й групп патогенности относятся к возбудителям особо опасных инфекционных заболеваний.

3.3 Планирование лаборатории

Рекомендации и правила по принципам размещения лабораторий, описываемые ниже, применимы к исследованиям по выявлению микроорганизмов, относящихся к группам патогенности 2, 3 и 4 для микробиологии пищевых продуктов.

3.4 Участки лаборатории

3.4.1 Общие положения

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

3.4.2 Участки, связанные с работой с пробами и их исследованием

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

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

3.4.3 Общие участки

Отдельно должны быть предусмотрены следующие участки:

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

3.5 Расположение и оснащение помещений

3.5.1 Цели

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

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

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

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

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

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

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

3.5.2 Оборудование помещений

Чтобы уменьшить риск загрязнения пылью и, следовательно, микроорганизмами (для 2-й группы патогенности необходимо соблюдать национальные нормативные документы), помещения для проведения исследований должны быть построены и оборудованы следующим образом:

a) Стены, потолки и полы должны быть гладкими, стойкими к моющим и дезинфицирующим средствам, используемым в лаборатории, легко мыться.

b) Полы не должны быть скользкими.

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

d) При проведении исследований окна и двери должны быть закрытыми. Конструкция окон и дверей должна исключать возможность скопления пыли и облегчать их чистку. Окружающая температура (от 18 °С до 27 °С) и качество воздуха (содержание микроорганизмов, скорость распространения пыли и т. д.) должны быть сопоставимы с проведением исследований. Для этой цели рекомендуется вентиляционную систему оборудовать фильтрами для поступающего в помещение воздуха и на выходе воздуха из него.

f) Необходимо установить адекватную систему вытяжной вентиляции, чтобы предотвратить распыление при работе, возникающее при приготовлении дегидратированных питательных сред, пылеобразных и порошковых образцов.

g) Если испытания необходимо проводить в атмосфере низкого уровня контаминации (загрязнения), комната должна быть специально оборудована чистым ламинарным кабинетом с потоком воздуха и/или безопасным боксом.

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

3.5.3 Прочие условия

Необходимо также предусмотреть выполнение следующих условий:

- подводка воды надлежащего качества для использования;
- наличие электрического питания;
- подводка газа (по трубам — централизованного или в баллонах);
- достаточное освещение в каждой зоне лаборатории;
- поверхности лабораторного инвентаря и мебели должны быть изготовлены из гладкого, непроницаемого материала, который легко мыть и дезинфицировать;
- лабораторная мебель должна быть разработана таким образом, чтобы облегчить ее обработку (например передвижная мебель);
- в помещениях, где проводят исследования образцов, не должны находиться мебель, документация и другие вещи, которые не применяются для проведения анализа;
- документация, используемая в работе с образцами, должна храниться в закрытых шкафах или ящиках столов;
- в каждой комнате, где проводят исследования, необходимо установить раковины для мытья рук и, если необходимо, в других участках, предпочтительно около двери;
- наличие автоклава для обеззараживания зараженных отработанных материалов и использованных питательных сред, если нет специальной системы для удаления зараженных отходов для сжигания на месте;
- обеспечение защитных систем для борьбы с огнем (огнетушители, ведра и т. д.) системой аварийного электропитания, аварийного обеспечения водой для душа и промывания глаз;
- обеспечение средствами для оказания первой помощи.

3.6 Чистка и дезинфекция

Объектами уборки и дезинфекции являются:

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

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

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

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

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

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

Примечание — Могут также использоваться другие методы для оценки загрязнения поверхностей и воздуха. См. ИСО 18593.

4 Требования к персоналу

4.1 Общие положения

Общие требования к квалификации персонала изложены в стандарте ИСО 17025.

4.2 Квалификация

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

Квалификация может быть установлена в пределах лаборатории с помощью внутреннего контроля качества (см. 15.1.2).

Примечание — Одна из причин плохого выполнения работы (пипетирование, плохая гомогенность первичной суспензии, подсчет и т. д.) в случае учета числа колоний описана в ИСО 14461-1.

4.3 Проверка квалификации персонала лаборатории

Проверку квалификации работающего персонала в лаборатории необходимо проводить регулярно, основываясь на объективных параметрах. Она включает участие в программах по внутреннему контролю качества, проверку квалификации (см. ИСО 43-1), использование стандартных образцов или проверку по тестам самооценки при подсчете микроорганизмов, как описано в ИСО 14461-2.

4.4 Гигиена

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

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

b) На волосы головы и бороду следует надеть защитные повязки.

c) Ногти следует содержать в чистоте и желательно короткими.

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

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

d) Люди, имеющие инфекционные заболевания кожи или страдающие заболеваниями кожи, должны предпринимать меры предосторожности, если микроорганизмы от них способны заразить образцы, что может отразиться на результатах испытаний.

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

h) Запрещается осуществлять пипетирование ртом.

5 Аппаратура и оборудование

5.1 Общие положения

В соответствии с установившейся лабораторной практикой всю аппаратуру и оборудование содержат в чистоте и в хорошем рабочем состоянии. Перед использованием оборудование следует проверить в соответствии с инструкцией. В процессе работы оборудование периодически проверяют по определенным характеристикам, указанным в соответствующих инструкциях.

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

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

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

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

Все неопределенности измерений, приведенные в данном разделе, связаны с рассматриваемой здесь аппаратурой и оборудованием, но не с методом анализа в целом.

В этом разделе установлены требования, предъявляемые к точности измерительного оборудования. Они основаны на практической допустимости отклонений, позволяющей гарантировать контроль оборудования в рабочей деятельности. Установленная точность связана с метрологической неопределенностью прибора.

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

5.2 Бокс биологической безопасности для микробиологических исследований

5.2.1 Описание

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

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

Кабинеты для использования в лабораториях микробиологии пищевых продуктов разделяются на четыре типа:

a) Боксы биологической безопасности класса I — это открытые спереди безопасные вытяжные шкафы, защищающие оператора и окружающую среду, но не защищающие продукт от загрязнения извне. Потенциально инфицированные аэрозоли будут циркулировать внутри бокса и затем поглощаться фильтром. Отфильтрованный воздух затем поступает в атмосферу; если этого не происходит, воздух должен пройти через два сухих воздушных фильтра (HEPA), установленных последовательно. Боксы биологической безопасности класса I не допускаются для работы с микроорганизмами 2-й группы патогенности из-за трудностей в поддержании и обеспечении соответствующей безопасности оператора.

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

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

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

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

В боксах биологической безопасности не допускается использовать газовые горелки или установки для сжигания отходов. В боксах применяют одноразовое оборудование (бактериологические петли, пипетки и т. д.).

Примечание — Газовую горелку применяют при условии создания маленького пламени, таким образом, чтобы не нарушить поток воздуха.

5.2.2 Использование

В боксах биологической безопасности не допускается наличие оборудования, которое не применяется в работе.

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

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

5.2.3 Очистка и дезинфекция

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

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

Боксы биологической безопасности должны окуриваться перед заменой фильтра или плановым обслуживанием.

После очистки бокса для обеззараживания можно использовать ультрафиолетовые (УФ) лампы. УФ лампы регулярно очищают или заменяют в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.2.4 Техническое обслуживание и контроль

Необходимо использовать боксы биологической безопасности, которые предназначены для применения в лаборатории в соответствии с существующей окружающей средой.

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

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

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

5.3 Весы и гравиметрические разбавители

5.3.1 Использование и неопределенность измерения

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

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

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

Если нет других указаний, максимальная допустимая погрешность — не более 1 % при взвешивании образцов для анализа.

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

5.3.2 Очистка и обеззараживание

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

5.3.3 Проверка показателей и калибровка

Обученный оператор должен регулярно проверять рабочие характеристики системы взвешивания во время использования и после очистки с помощью контрольных разновесов. Проверку весов проводят по всему диапазону, частота проверки зависит от интенсивности использования.

Контрольные разновесы могут быть проверены также непосредственно после калибровки весов.

5.4 Гомогенизаторы, смесители и миксеры

5.4.1 Описание

Это оборудование используется для получения исходной суспензии из испытуемой пробы для анализа нежидких продуктов.

Необходимо использовать следующую аппаратуру:

- перистальтический смеситель (stomacher) со стерильными пакетами, возможно с устройством для регулирования скорости и таймером;
- ротационный гомогенизатор (блендер), способный создавать скорость от 8000 до 45000 об/мин включительно, со стерилизуемыми стеклянными или металлическими флаконами, закрываемыми крышками;
- вибрационный миксер (вибратор) со стерильными пакетами; или
- другая система гомогенизации эквивалентной эффективности.

В некоторых случаях перемешивание может быть выполнено вручную с использованием стерильных стеклянных бусинок, имеющих соответствующий диаметр (приблизительно 6 мм; см. ИСО 6887-4 и ИСО 8261).

5.4.2 Применение

Обычно рабочее время гомогенизатора перистальтического типа составляет от 1 до 3 мин (см. ИСО 6887-2, ИСО 6887-4 и ИСО 8261 для конкретных пищевых продуктов).

Для некоторых видов пищевых продуктов эту аппаратуру использовать нельзя:

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

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

Вибрационный миксер можно использовать для большинства пищевых продуктов, включая твердые или сухие изделия. Обычное время работы составляет от 0,5 до 1 мин. Если микроорганизмы расположены глубоко внутри клейкой структуры продукта, образец перед обработкой следует разрезать на маленькие кусочки.

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

5.4.3 Очистка и обеззараживание

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

Ротационные гомогенизаторы моют и стерилизуют после каждого применения.

5.4.4 Техническое обслуживание

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

5.5 pH-метр

5.5.1 Описание

pH-метр применяют для измерения при определенной температуре разности потенциалов между измеряющим электродом и электродом сравнения, погруженными в продукт. pH-метр должен обеспечивать измерение с точностью до $\pm$ 0,05 единицы pH, а его разрешение составлять 0,01 единицы pH.

pH-метр должен быть оснащен ручным или автоматическим определителем температуры.

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

5.5.2 Использование pH-метра

pH-метр используют для измерения значения pH питательных сред и реактивов, а также для проверки их качества после стерилизации.

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

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

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

5.5.3 Проверка и контрольное измерение

pH-метр проверяют в соответствии с инструкцией изготовителя, используя не менее двух, а лучше трех стандартных буферных растворов, ежедневно перед началом работы. При этой проверке определяют максимально допустимые погрешности в зависимости от применения.

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

После проверки pH-метра с двумя определенными стандартными буферными растворами pH необходимо проверить, используя третий буферный раствор, обычно именуемый контрольным буферным раствором, например имеющим pH 5 или pH 8.

Когда при проверке устанавливается, что результат находится за пределами максимально допустимой ошибки, выполняют контрольное исследование в соответствии с инструкцией изготовителя.

Измерение может сопровождаться калибровкой, которая позволит оценить неопределенность измерения данного pH-метра.

5.5.4 Обслуживание

Электроды проверяют и поддерживают в удовлетворительном состоянии в соответствии с инструкцией изготовителя. Ежедневно проверяют:

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

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

Электроды хранят в соответствии с инструкцией изготовителя.

5.6 Автоклав

5.6.1 Описание

Автоклав позволяет поддерживать в камере температуру насыщенного пара и используется для уничтожения (умерщвления) микроорганизмов.

Автоклав должен быть оснащен:

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

Автоклав должен быть оснащен таймером и устройством для записи температуры.

5.6.2 Использование

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

Для уничтожения (разрушения) микроорганизмов насыщенный пар в камере должен быть при температуре не менее 121 °С.

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

Предпочтительно использовать отдельные автоклавы для этих двух процессов. После автоклавирования все материалы и оборудование необходимо охладить в автоклаве перед их извлечением.

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

5.6.3 Обслуживание

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

5.6.4 Проверка и калибровка

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

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

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

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

5.7 Аппарат для приготовления питательных сред

5.7.1 Описание

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

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

5.7.2 Использование

Необходимо всегда следовать инструкциям изготовителя.

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

5.7.3 Обслуживание

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

5.7.4 Проверка

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

Контрольно-измерительные приборы должны быть в хорошем рабочем состоянии и всегда подготовлены к работе.

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

Необходимо проверять температуру и продолжительность каждого цикла.

5.8 Термостат (инкубатор)

5.8.1 Описание

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

5.8.2 Использование

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

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

Стенки термостата должны быть защищены от солнечного света.

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

При загрузке термостатов необходимо проследить за циркуляцией воздуха (см. 10.2.4).

5.8.3 Очистка и санитарная обработка

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

5.8.4 Проверка

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

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

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

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

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

Термометр или записывающая термопара, используемые для постоянного контроля качества термостата, необходимо установить в положение, которое определено по данным температурного профиля для достижения необходимой температуры.

Температуру термостата проверяют каждый рабочий день. С этой целью каждый термостат должен включать не менее одного термометра, шарик которого погружен в глицерин (или другое подходящее вещество), находящийся в герметично упакованном сосуде.

Можно использовать другие системы проверки работы с равноценными характеристиками.

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

5.9.1 Описание

Холодильники представляют собой камеры, которые позволяют поддерживать хранение при пониженной температуре. Для хранения проб пищевых продуктов температура должна быть (3 ± 2) °С (максимальные допустимые ошибки), за исключением специальных случаев использования.

Для других вариантов использования температура, если иначе не определено, должна быть (5 ± 3) °С.

5.9.2 Использование

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

- незасеянные питательные среды и реактивы,
- испытательные образцы для исследований,
- культуры микроорганизмов и инкубированные питательные среды.

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

5.9.3 Проверка

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

5.9.4 Обслуживание и очистка

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

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

5.10 Морозильная камера и низкотемпературная установка для глубокого замораживания

5.10.1 Описание

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

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

5.10.2 Использование

5.10.2.1 Морозильная камера

Необходимо иметь разные камеры или разные контейнеры с достаточным пространством, чтобы обеспечить физическое разделение при хранении:

- неинокулированных реактивов,
- образцов для анализа и
- культур микроорганизмов.

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

5.10.2.2 Установка для глубокого замораживания

Морозильные камеры применяют для хранения микроорганизмов, контрольных и/или рабочих культур и реагентов. Загружают их таким способом, чтобы поддерживалась низкая температура и предотвращалось взаимное загрязнение между микроорганизмами и реагентами.

5.10.3 Проверка

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

5.10.4 Техническое обслуживание

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

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

5.11 Баня термостатическая контролируемая

5.11.1 Описание

Баня с терморегулятором, заполненная жидкостью (вода, этилен гликоль и т. д.), с подогнанной крышкой или без нее или другим устройством, ограничивающим испарение, которое требуется, чтобы поддерживать необходимую температуру. Контроль температуры часто более точен, чем в воздушном термостате, и обеспечивает максимально допустимое отклонение $\pm$ 0,5 °С и менее. Рабочие температуры и требуемые максимально допустимые погрешности устанавливают для каждого отдельного метода. Необходима система охлаждения для поддержания температуры, близкой к окружающей температуре или ниже данной температуры.

5.11.2 Использование

В основном баню используют для решения следующих задач:

- инкубации при постоянной температуре засеянных питательных сред;
- поддержания стерильных расплавленных агаровых сред при приготовлении сред;
- поддержания температуры стерильных расплавленных агаровых сред для использования в определенных методах;
- приготовления первичных образцов суспензий или растворов при контролируемой температуре;
- обработки нагреванием первичных образцов суспензии при контролируемой температуре (например пастеризация).

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

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

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

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

Глубина погружения должна препятствовать попаданию воды через крышку.

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

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

5.11.3 Проверка

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

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

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

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

5.11.4 Обслуживание

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

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

Жидкость из бань должна регулярно выливаться, баня очищаться, санироваться и снова заполняться жидкостью, в зависимости от частоты использования, а также после того, когда происходит разбрызгивание или протекание бани.

5.12 Пароварки, включая бани с кипящей водой

5.12.1 Описание

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

5.12.2 Использование

Данные приборы используются, главным образом, для следующего:

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

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

Можно использовать автоклав с автономной парообразующей способностью.

5.12.3 Обслуживание

Пароварки и бани с кипящей водой необходимо содержать в чистоте.

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

5.13 Стерилизационный сушильный шкаф

5.13.1 Описание

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

5.13.2 Использование

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

Стерилизационный сушильный шкаф не допускается использовать для стерилизации изделий из каучука и пластмассы.

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

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

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

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

Как только достигается температура стерилизации, процедура стерилизации должна длиться не менее одного часа при температуре 170 °С или поддерживать равноценный режим по параметрам время/температура.

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

5.13.3 Проверка

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

Стерилизационный сушильный шкаф должен быть оснащен калиброванным термометром, термопарой или устройством регистрации температуры, соответствующей точности, которые являются независимыми от автоматической системы регуляции температуры.

Контролирующее устройство должно иметь разрешение 1 °С или менее при температуре, используемой в сушильном шкафу.

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

5.13.4 Обслуживание

По мере необходимости моют внутренние поверхности сушильного шкафа.

5.14 Микроволновая печь

5.14.1 Описание

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

5.14.2 Использование

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

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

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

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

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Проводите нагревание изделий с осторожностью. Содержимое сосудов может перегреваться и выкипать, возможен взрыв флаконов.

Плавление агаровых питательных сред проводят при низкой мощности (например режим размораживания) и нагревание воды (например от 50 $см^3$ до 100 $см^3$ воды в лабораторном стакане для микроволновой печи) рекомендуется для дополнительного контроля процесса нагревания.

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

5.14.3 Проверка

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

5.14.4 Обслуживание

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

Регулярно осматривают целостность уплотнителя двери печи, а печь регулярно проверяют на потерю излучения.

5.15 Машина для мытья стеклянной посуды

5.15.1 Описание

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

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

5.15.2 Использование

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

5.15.3 Проверка

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

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

5.15.4 Обслуживание

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

Более частое обслуживание может потребоваться при интенсивном использовании машины для мытья стеклянной посуды в регионах с повышенной жесткостью воды.

5.16 Оптический микроскоп

5.16.1 Описание

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

5.16.2 Использование

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

5.16.3 Обслуживание

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

После каждого исследования удаляют иммерсионное масло с линз и прилегающих частей, используя ткань для протирки линзы. Можно использовать растворитель, рекомендованный изготовителем. Регулярно удаляют жир с поверхности окуляра, вызванный прикосновением ресниц.

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

5.17 Газовая горелка и прокаливатель проволоки

5.17.1 Описание

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

Газовые или электрические прокаливатели проволоки достигают температуры красного каления без образования пламени и используются для стерилизации бактериологических петель и непосредственно проволоки, используемой для работы с микробиологическими культурами.

5.17.2 Использование

Газовую горелку используют для стерилизации металлических петель и прямых проволок, доводимых до температуры красного каления, и для стерилизации пламенем других мелких прочных изделий и оборудования для микробиологической работы.

Прокаливатели используют для стерилизации металлических петель и прямых проволок при работе с патогенными бактериями, поскольку они предотвращают разбрызгивание материала и позволяют избежать риска перекрестного заражения.

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

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

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

5.17.3 Обслуживание

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

5.18 Дозатор (устройство для разливки) питательных сред и реактивов

5.18.1 Описание

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

5.18.2 Использование

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

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

5.18.3 Проверка

Погрешность измерения дозатора должна соответствовать максимально допустимой погрешности при дозировании объема, который необходимо разлить, и не должна превышать ± 5 %. Максимальная допустимая погрешность измерения объема разлитой жидкости, используемой для приготовления десятичных разведений, ± 2 %.

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

5.18.4 Очистка и обслуживание

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

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

5.19 Вихревой механический смеситель (Вортекс)

5.19.1 Описание

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

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

5.19.2 Использование

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

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

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

5.19.3 Проверка

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

5.19.4 Обслуживание

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

5.20 Устройство для подсчета колоний

5.20.1 Описание

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

5.20.2 Использование

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

5.20.3 Проверка

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

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

5.20.4 Обслуживание

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

5.21 Оборудование для культивирования в измененной атмосфере

5.21.1 Описание

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

При установке и обслуживании следуют инструкциям изготовителя оборудования.

5.21.2 Использование

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

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

Условия могут требовать модификации в зависимости от потребностей конкретного микроорганизма.

5.21.3 Проверка

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

5.21.4 Обслуживание

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

Оборудование необходимо регулярно очищать и проводить санитарную обработку.

5.22 Центрифуга

5.22.1 Описание

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

5.22.2 Использование

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

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

5.22.3 Проверка

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

5.22.4 Обслуживание

Центрифуги регулярно очищают и обеззараживают. После проливания материала с микроорганизмами или потенциально зараженных проб центрифуги дополнительно очищают и обеззараживают.

Необходимо постоянное обслуживание центрифуг.

5.23 Нагревательная плитка и кожух с нагревом

5.23.1 Описание

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

5.23.2 Использование

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

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

5.23.3 Обслуживание

Все брызги и пролитый материал сразу удаляют, как только остынет нагревательный прибор.

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

5.24.1 Описание

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

5.24.2 Использование

Прибор применяют для разливки жидкого образца, гомогенного образца или разведения на соответствующей агаровой чашке для подсчета колоний. После инкубации колонии распределяются по линиям, по которым была распределена жидкость. Подсчитывают число колоний на определенной площади, используя специальную (координатную) сетку для подсчета, поставляемую с оборудованием, и определяют количество колоний.

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

Чашки должны быть подсушены перед использованием, чтобы удалить избыток влаги.

Дозирующая система должна проходить санитарную обработку и ополаскиваться стерильной водой перед разливкой каждого образца и после окончания работы.

5.24.3 Проверка

Проверяют ежедневно угол наклона конца дозирующей иглы, используя вакуум для удерживания покровного стекла относительно передней части иглы. Покровное стекло должно быть параллельно поверхности агара и расположено от нее на расстоянии 1 мм.

Рисунок распределения образца следует проверить с помощью смываемых чернил. Рисунок распределения образца должен быть наиболее плотным около центра пластины, где начинается разливка образца, и становиться менее плотным в точке подъема кончика иглы дозатора. Чистая часть чашки должна быть в центре и иметь диаметр около 2,0 см.

Следует выполнять ежедневную проверку, чтобы обеспечить расположение наконечника дозирующей иглы под правильным углом к поверхности агара, используя покровное стекло и шаблон уровня, поставляемый вместе с прибором.

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

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

5.24.4 Обслуживание

Дезинфекция трубок дозатора и дозирующей иглы может быть достигнута промыванием раствором, содержащим от 0,5 % до 1 % свободного хлора. Затем прибор следует промыть стерильной или деионизированной водой.

Засорение дозатора и дозирующей иглы можно предотвратить, не допуская попадания частиц перед загрузкой суспензии образца, отбирая его из надосадочной жидкости.

Пролитый материал необходимо немедленно удалить, а дозатор очищать регулярно.

Дозатор необходимо обслуживать и проверять в зависимости от интенсивности использования.

5.25 Дистилляторы, деионизаторы и установки обратного осмоса

5.25.1 Описание

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

5.25.2 Использование

Устанавливают, проверяют и используют оборудование в соответствии с инструкциями изготовителя, принимая во внимание местоположение подачи воды в лаборатории, электрическое питание и стоки для отходов.

5.25.3 Проверка

Качество воды следует проверять регулярно, особенно когда используют оборудование после хранения, на электропроводность, которая должна быть не более 25 мкСм/см (эквивалентно удельному сопротивлению 40000 Ом · см) для приготовления реактивов и питательных сред.

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

5.25.4 Обслуживание

Дистилляторы необходимо промывать и освобождать от накипи с частотой, которая зависит от жесткости пропускаемой через них воды.

Деионизаторы и дистилляторы обслуживают в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.26 Таймеры и счетчики времени

5.26.1 Описание

Таймеры и интегральные счетчики времени — это приборы, которые используют в лаборатории для определения продолжительности времени, или время является определяющим параметром.

5.26.2 Использование

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

С встроенными интегральными таймерами на лабораторном оборудовании (например на автоклавах, центрифугах, гомогенизаторах) необходимо обращаться в соответствии с инструкциями изготовителя. Эти таймеры должны обеспечивать требуемую точность.

5.26.3 Проверка

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

5.26.4 Обслуживание

Регулярно чистят и проверяют таймеры на надлежащее функционирование.

Интегральные счетчики времени следует проверять в рамках технического обслуживания прибора.

5.27 Пипетки и пипеточные дозаторы

5.27.1 Описание

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

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

5.27.2 Использование

Не допускается использование поврежденных или разбитых (бракованных) пипеток.

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

Нельзя проводить пипетирование ртом при работе с микроорганизмами, за исключением работы с неконтаминированными жидкостями.

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

5.27.3 Проверка

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

Калибровка пипеток/дозаторов описана в ИСО 835 (все части) и ИСО 8655-1.

Перед использованием новые пипеточные дозаторы проверяют. Проверку проводят через регулярные интервалы времени в зависимости от частоты и характера использования. Проверкой подтверждают, что приборы соответствуют максимально допустимой погрешности, определенной в соответствии с ИСО 8655-1. Выполняют промежуточные гравиметрические проверки, используя дистиллированную или деионизированную воду для того, чтобы переносимые объемы оставались в рамках максимально допустимых ошибок.

Проверяют все новые партии мерных пипеток.

5.27.4 Обслуживание

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

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

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

5.28.1 Описание

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

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

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

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

Могут быть использованы устройства адекватной точности, которые соответствуют международному стандарту в качестве рабочих термометров после проверки их работы.

5.28.2 Использование

Термометры и другие устройства контроля температуры должны обеспечивать измерение температуры, требуемое методикой в установленных пределах с максимально допустимой погрешностью.

Неопределенность измерения для мониторинга температуры должна быть в четыре раза меньше, чем диапазон максимально допустимой погрешности. Например, для заданной максимально допустимой погрешности ± 1 °С погрешность измерения должна быть ± 0,25 °С; для заданной максимально допустимой погрешности ± 0,5 °С погрешность измерения должна быть ± 0,125 °С. Неопределенность измерения калибровки контрольного термометра необходимо также принимать в расчет при определении рабочей температуры.

В целях обеспечения достоверных показаний термометры или термоэлементы, помещенные в воздушные термостаты, должны быть в контейнерах, заполненных глицерином, жидким парафином или полипропиленгликолем, являющимися буфером, предохраняющем от влияния тепла, которое возникает при открывании дверцы.

При использовании термометров полного погружения полностью погружают только шарик термометра.

Термометры, помещенные в водяные бани, должны быть погружены в воду в соответствии с индивидуальными техническими требованиями, например термометры частичного погружения необходимо погрузить на глубину, указанную для данного термометра, например 76 или 100 мм.

Ртутные термометры в стекле хрупкие и, если есть риск разбития, они должны быть помещены внутри защитных устройств, которые не соприкасаются с термометрами, измеряющими температуру.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Ртуть опасна для здоровья. Разбитые термометры удаляют в соответствии с инструкциями.

5.28.3 Проверка

Контрольные термометры должны быть калиброваны по всему диапазону отслеживаемых стандартов перед начальным использованием и затем не реже одного раза каждые 5 лет. Промежуточную калибровку по одной точке (например, температуру таяния льда) следует выполнять для проверки точности работы термометра.

Контрольные термопары должны быть полностью калиброваны по прослеживаемым стандартам перед начальным использованием в соответствии с инструкцией изготовителя. Промежуточные проверки следует проводить по показаниям контрольного термометра для проверки точности работы прибора.

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

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

5.28.4 Обслуживание

Термометры и термоэлементы необходимо содержать в чистоте и рабочем состоянии.

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

5.29 Иммуномагнитный сепаратор

5.29.1 Описание

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

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

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

5.29.2 Использование и проверка

При использовании руководствуются инструкцией изготовителя и теми инструкциями, которые приведены в конкретных стандартах (например для E.coli 01157).

В ручных системах проверяют скорость вращения миксера.

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

Во время процедуры ручного разделения не допускается перекрестное заражение.

5.29.3 Обслуживание

Оборудование осматривают и поддерживают в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.30 Система фильтрации

Используемая система фильтрации должна соответствовать описанной в ИСО 8199.

5.31 Другое оборудование и программное обеспечение

Другое оборудование и связанное с ним программное обеспечение должно обеспечивать требуемую точность и выполнение спецификаций, необходимых для проводимых испытаний. Программы калибровки следует разрабатывать для ключевых показателей качества или уровней, там где эти свойства оказывают существенное влияние на результат. Перед повседневной работой калибруют или проверяют оборудование, чтобы подтвердить его соответствие требованиям лаборатории и техническим условиям для выполнения необходимых стандартных операций. Любые изменения конфигурации или модификации программ, проведенные в лаборатории, должны быть проверены, чтобы гарантировать, что измененное программное обеспечение дает надежный и правильный результат.

6 Подготовка стеклянной посуды и других лабораторных материалов

6.1 Подготовка

Стеклянная посуда и другие лабораторные материалы, используемые в микробиологии, должны иметь удобную конструкцию, использоваться должным образом и проходить соответствующую подготовку, чтобы гарантировать их чистоту и/или стерильность вплоть до момента использования.

Это оборудование должно быть разработано таким образом, чтобы предотвратить или ограничить контакт между оператором и инфекционным материалом.

Пробирки и флаконы должны быть закрыты соответствующими пробками. Если необходимо, стеклянная посуда, которая будет стерилизоваться (например пипетки), должна быть помещена в специальные контейнеры или обернута в соответствующий материал (специальная бумага, алюминиевая фольга и т. д.). Стеклянную посуду, которая стерилизуется в автоклаве, необходимо подготовить пустой, чтобы позволить пару иметь свободный доступ к посуде, иначе стерилизация не будет достигнута.

6.2 Стерилизация/дезактивация

6.2.1 Общие положения

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

6.2.2 Стерилизации сухой высокой температурой

Стеклянную посуду стерилизуют при высокой температуре в стерилизационном сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение не менее 1 ч или при аналогичном режиме.

6.2.3 Стерилизации паром высокой температуры

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

6.2.4 Дезактивация с помощью химических реагентов

Используют химические реагенты (например вещества на основе хлора, спирты, четвертичные соединения аммония) в соответствующих концентрациях и в течение соответствующего времени контакта.

Следят, чтобы остатки химических веществ не влияли на жизнедеятельность микроорганизмов.

6.3 Одноразовое оборудование и материалы

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

Необходимо проверить, чтобы такое оборудование подходило для использования в микробиологии (в особенности, это касается его стерильности), и чтобы материал не содержал веществ, подавляющих рост микроорганизмов (см. ИСО 9998).

6.4 Хранение чистой стеклянной посуды и других материалов

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

Стеклянная посуда и материалы должны содержаться в условиях, которые гарантируют их стерильность. Одноразовое оборудование хранят в соответствии с инструкциями изготовителя, следя за тем, чтобы не было повреждения упаковки. Оборудование, подготовленное в лаборатории, хранят в чистоте.

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

6.5 Применение обеззараживания (деконтаминации) и дезинфекции

6.5.1 Обеззараживание одноразового оборудования

До удаления одноразового оборудования его обеззараживают.

Помимо методов, описанных в этом разделе, дополнительно применяют сжигание. Если в помещении есть установка для сжигания отходов, дезактивацию и удаление следует выполнять одновременно.

6.5.2 Дезактивация стеклянной посуды и материалов перед использованием

Обычно стерилизацию оборудования рекомендуется осуществлять влажным паром (см. 6.2.3) или сухим горячим воздухом (см. 6.2.2).

В некоторых случаях (например при отборе образцов в полевых условиях) может использоваться химическая дезактивация. После такой обработки оборудование должно быть очищено от ингибирующих веществ.

6.5.3 Дезактивации стеклянной посуды и материалов после использования

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

Могут использоваться альтернативные методы, другие чем автоклавирование, если это допускается инструкциями.

Автоклавируют все оборудование, которое было в контакте с микробиологическими культурами (плотные или жидкие питательные среды), включая контейнеры многократного использования, до мытья.

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

Пастеровские пипетки используют однократно.

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

6.6 Обработка отходов

Правильное обеззараживание загрязненных материалов непосредственно не влияет на качество анализа образца, но является показателем хорошего управления в лаборатории.

Обработку отходов следует выполнять в соответствии с инструкциями по охране здоровья и окружающей среды.

Система идентификации и отделения зараженных материалов и их контейнеров должна быть установлена:

- для незараженных отходов (например неиспользованные образцы продовольствия), которые можно удалить вместе с бытовыми отходами,
- скальпелей, игл, ножей, разбитых стекол,
- зараженного материала для автоклавирования и повторного использования,
- зараженного материала для автоклавирования и обеззараживания или только для обеззараживания, если материал должен быть сожжен (см. также специальные требования для микроорганизмов 3-й категории риска ниже).

Сжигание зараженных материалов и их контейнеров следует выполнять в соответствии с правилами техники безопасности и национальными правилами по охране окружающей среды.

Материалы, загрязненные микроорганизмами 2-й группы патогенности, и их контейнеры сначала стерилизуют в автоклаве, а затем уже сжигают.

6.7 Мойка

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

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

После мойки оборудование многократного использования должно быть свободно от остатков, которые могут влиять на последующий рост микроорганизмов.

7 Приготовление и стерилизация питательных сред

Питательные среды приготавливают и стерилизуют в соответствии с ИСО 11133-1 и ИСО 11133-2.

8 Лабораторные пробы

8.1 Отбор проб

8.1.1 Общие положения

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

Проба должна быть защищена от постороннего загрязнения воздухом, от типового контейнера, от используемых устройств для осуществления отбора проб. Типовой контейнер не следует заполнять не более чем на три четверти, чтобы избегать проливания, что обеспечит надежное перемешивание пробы в лаборатории.

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

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

Проба должна быть представлена в оригинальном закрытом контейнере.

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

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

8.1.2 План осуществления выборки

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

8.2 Транспортирование

Способ транспортирования проб в лабораторию должен гарантировать сохранность.

Пробы в лабораторию доставляют быстро, поддерживая исходные условия хранения.

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

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

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

Не следует использовать свободный лед, поскольку при поломке или разбитии контейнера может произойти загрязнение образца.

Если нет других указаний в специальных стандартах (например ИСО 6887 и ИСО 8261), рекомендуют следующие температуры во время транспортирования:

- устойчивые продукты: окружающая температура (ниже 40 °С);
- замороженные или свежезамороженные изделия: ниже –15 °С, предпочтительно ниже –18 °С;
- другие изделия, не устойчивые при окружающей температуре: 1 °С—8 °С;
- образцы на тампонах: см. ИСО 18593 и ИСО 17604.

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

8.3 Получение проб

При получении образцов необходимо проверить их состояние.

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

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

Однако отчет об испытаниях должен включать пункт о достоверности результатов.

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

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

Контейнеры для проб проверяют на наличие очевидных физических дефектов.

Необходимо обратить внимание на следующее:

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

При получении скоропортящихся проб отмечают температуру транспортировки или температуру условного образца, транспортируемого вместе с настоящим именно для регистрации температуры.

Образцы необходимо исследовать скорее после их получения, предпочтительно в течение 24 ч, или по согласованию с заинтересованной стороной.

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

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

8.4 Хранение

Пробы, ожидающие экспертизу, хранят в условиях, которые сводят к минимуму изменение в числе присутствующих микроорганизмов.

Рекомендуются следующие температуры хранения образцов:

- устойчивые продукты: температура окружающей среды (18 °С—27 °С);
- замороженные или свежезамороженные изделия: ниже минус 15 °С, предпочтительно ниже минус 18 °С;
- другие продукты, не устойчивые при температуре окружающей среды, включая испорченные пищевые продукты (3 ± 1) °С (см. ИСО 6887-2 — ИСО 8687-4 или ИСО 8261);
- образцы на тампонах: см. ИСО 18593 и ИСО 17604.

8.5 Проба (навеска) для анализа

8.5.1 Специальные правила для отбора проб (навесок) для исследований

См. соответствующую часть ИСО 6887 или ИСО 8261, где описаны специальные правила для получения образцов для исследований и приготовления гомогенатов и исходной суспензии.

8.5.2 Сохранение и уничтожение лабораторных проб

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

Скоропортящиеся изделия необходимо заморозить.

Примечание — Обычной практикой является повторный анализ образцов из-за возможных изменений микробного статуса.

9 Экспертиза (исследование)

9.1 Гигиенические меры предосторожности при проведении исследований

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

До открывания обычных образцов участок вокруг предполагаемого места открывания обрабатывают 70 %-ным (по объему) спиртом (или другим аналогичным продуктом) и дают ему испариться. Перед вскрытием стерильной упаковки погружают область предполагаемого места открывания в раствор, содержащий 100—200 частей на миллион свободного хлора (или другой подходящий стерилизующий раствор) в течение не менее 10 мин, чтобы уничтожить микроорганизмы, которые могли бы заразить образец.

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

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

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

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

Все приборы и используемые инструменты необходимо поместить в подходящий контейнер для последующего обеззараживания или стерилизации.

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

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

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

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

d) работу необходимо выполнять без задержек;

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

h) для работы обычно используют одноразовое оборудование;

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

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

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

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

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

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

- при открытии чашек Петри, пробирок и флаконов;
- при использовании шейкеров, шприцов, центрифуг, и т. д.;
- при опорожнении пипеток;
- при стерилизации влажных петель и игл;
- при открывании ампул, содержащих высушенные замораживанием культуры.

Поэтому их формирование необходимо свести к минимуму.

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

Когда используют другие дезинфицирующие средства, а не 70 %-ный (по объему) спирт, для эффективной дезинфекции необходимо установить время контакта в соответствии с инструкциями изготовителя.

9.2 Приготовление исходной суспензии и разведений

9.2.1 Общие положения

Исходную суспензию и разведения приготавливают согласно соответствующей части ИСО 6887 или ИСО 8261. Интервал времени, занимающий конец подготовки исходной суспензии и момент инокуляции посевного материала в питательную среду, не должен превышать 45 мин, если специально не оговаривается в соответствующем стандарте.

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

9.2.2 Концентрирование

9.2.2.1 Центрифугирование или фильтрация с помощью мембранного фильтра

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

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

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

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

9.2.2.2 Иммуноразделение

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

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

10 Обработка результатов

10.1 Общие положения

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

Подсчет на плотных питательных средах основан на способности многих микроорганизмов продуцировать колонии на агаровых питательных средах, которые можно распознать невооруженным глазом или с помощью простого увеличительного стекла. Однако, если матрица содержит много частиц, которые могут повлиять на обнаружение колоний, или если количество бактерий очень мало, этот принцип невозможно использовать без первого отделения искомых микроорганизмов из матрицы (например фильтрацией или иммуноразделением). В таких случаях подсчет с использованием жидких питательных сред является часто оптимальной альтернативой.

10.2 Подсчет при использовании плотных питательных сред

10.2.1 Общие положения

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

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

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

10.2.2 Количество чашек Петри на каждое разведение

В микробиологии пищевых продуктов обычно используют одну чашку на каждое разведение микроорганизмов, согласно требованиям ИСО 17025.

В других случаях следует использовать две чашки для каждого разведения в соответствии с ИСО 8199.

10.2.3 Методы разливки чашек

10.2.3.1 Общие положения

Отбирают определенные объемы разведений для исследования, касаясь наконечником пипетки боковой стенки пробирки, чтобы удалить избыточную жидкость с внешней стороны пипетки. Поднимают

крышку стерильной чашки Петри так, чтобы было возможно внести содержимое пипетки в чашку. Расплавленную агаровую среду выливают при температуре 44 °С—47 °С в каждую чашку Петри. Необходимо наливать расплавленную среду таким образом, чтобы избежать ее попадания непосредственно в инокулят (посевной материал). Расплавленную среду и инокулят немедленно тщательно перемешивают для получения равномерного распределения микроорганизмов в питательной среде. Далее чашки помещают на горизонтальную поверхность, чтобы дать время охладиться и затвердеть питательной среде (время затвердевания агара не должно превышать 10 мин).

После расплавления агаровой среды, доведенной до необходимого состояния, флакон из водяной бани высушивают сухим чистым полотенцем, чтобы предотвратить загрязнение чашек водой бани. Необходимо следить, чтобы среда не попадала на внешнюю сторону флакона или на внутреннюю часть крышки чашки Петри во время разливки в чашки.

Для этого флакон или колбу необходимо держать фактически в горизонтальном положении и воздержаться от возврата флакона в вертикальное положение между этапами разливки питательной среды.

Если в исследуемом продукте предполагается присутствие колоний (например виды Proteus) с «ползучим» ростом, используют для анализа слой со стерильным «голодным» агаром или идентичной питательной средой, наносимые на затвердевший агар в чашки с посеянным материалом, чтобы предотвратить или свести к минимуму распространение такого «ползучего» роста.

10.2.4 Поверхностный посев

10.2.4.1 Общие положения

Методы посева, предназначенные для получения только поверхностных колоний на агаровых чашках, имеют некоторые преимущества по сравнению с методом разливки в чашки для выращивания микроорганизмов внутри агара.

Микроорганизмы не подвергаются действию высокой температуры расплавленной агаровой среды, поэтому количество колоний может быть выше, а подсчет более точным.

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

Чтобы облегчить равномерное распределение, поверхность затвердевшего агара необходимо подсушить в соответствии с ИСО 11133 или, как определено другим соответствующим международным стандартом. В таком случае посевной материал абсорбируется в течение 15 мин.

10.2.4.2 Метод посева с помощью шпателя

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

Если необходимо подсчитать незначительное количество микроорганизмов в случае определенных продуктов, предел обнаружения можно увеличить в десять раз посредством анализа 1,0 $см^3$ пробы в случае жидких продуктов и 1,0 $см^3$ исходной суспензии в случае других продуктов. Для этой цели, 1,0 $см^3$ посевного материала распределяют или по поверхности большой чашки Петри (диаметром 140 мм) или по поверхностям трех обычных чашек Петри (диаметром 90 мм).

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

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

10.2.4.3 Метод спирального нанесения материала

10.2.4.3.1 Общие положения

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

Используемое оборудование — спиральный дозатор — описан в 5.24.

10.2.4.3.2 Приготовление чашек с агаровой средой

Для приготовления чашек с агаровой средой рекомендуется использовать автоматический дозатор со стерильной системой дозирования, чтобы получить чашки с одинаковым объемом агаровой среды.

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

Альтернативно можно использовать готовые агаровые чашки, имеющиеся в продаже.

10.2.4.3.3 Процедура нанесения посевного материала и подсчет

Обеззараживают кончик дозирующей иглы и трубку, обмакнув их в растворе гипохлорита натрия (см. 5.24.4), а затем в стерильную воду через систему, перед тем как втянуть в дозирующую иглу жидкий образец.

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

После термостатирования на поверхность засеянной агаровой среды помещают специальную сетку для подсчета количества микроорганизмов в чашках, засеянных по спирали. Для определения количества микроорганизмов используют «правило двадцати». Подсчет колоний начинают, выбрав клин и начав подсчет от наружного края первого сегмента по направлению к центру, пока не подсчитают 20 колоний. Процедуру завершают подсчетом в сегменте, содержащем двадцатую колонию. На противоположной стороне чашки подсчитывают соответствующий участок и делят число колоний, подсчитанных по обе стороны, на объем образца, нанесенный на два данных участка. Объемы образца, соответствующие каждой части счетной сетки, приведены в инструкциях, которые прилагаются к каждому спиральному дозатору.

10.2.5 Термостатирование

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

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

Примечание — В определенных случаях, чтобы не спутать частицы исследуемого продукта с колониями микроорганизмов, полезно будет приготовить дубликаты засеянных чашек, которые хранят при температуре (3 ± 2) °С, для последующего сопоставления при подсчете с инкубированными засеянными чашками. Можно также использовать бинокулярное увеличительное стекло, чтобы отличить частицы продукта и колонии микроорганизмов.

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

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

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

10.3 Обработка результатов, полученных на плотных средах

10.3.1 Подсчет колоний

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

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

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

В различных методах расчетов, приведенных в 10.3.2, необходимо принять во внимание чашки, не содержащие колоний, если такие чашки имеются.

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

10.3.2 Обработка результатов

10.3.2.1 Общие положения

10.3.2.1.1 В этом подразделе рассматриваются общие случаи:

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

Такие цифры определены в соответствующих стандартах на конкретный метод испытания.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

За результат принимают количество N микроорганизмов на миллилитр (жидких продуктов) или на грамм (прочих продуктов).

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

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

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

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

Выполнив округление результатов в соответствии с вышеописанным, получаем число микроорганизмов равное 17000 или $1{,}7 \times 10^4$ на миллилитр или на грамм продукта.

10.3.2.3 Метод вычисления: после проведения идентификации

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

$$a = \frac{b}{A} \cdot C, \qquad (2)$$

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

C — общее число предполагаемых колоний, подсчитанных в чашке.

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

Количество *N* идентифицированных микроорганизмов, присутствующих в испытуемой пробе, рассчитывают путем подстановки вместо ΣC значения Σa в формуле, приведенной в 10.3.2.2.

Полученный результат округляют в соответствии с 10.3.2.2.

Результат выражают в соответствии с 10.3.2.2.

Пример — Подсчет дал следующие результаты:

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

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

Тестирование отобранных колоний было выполнено следующим образом:

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

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

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

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

10.3.2.4 Метод вычисления: малые количества

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

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

Согласно ИСО 13843 определение предела обнаружения будет таким: «Наименьшая средняя концентрация частиц *x* в образце для анализа (навеске), если ожидаемая относительная стандартная неопределенность равна установленному значению (RSD)».

RSD — это относительное квадратное отклонение, которое вычисляют путем деления стандартного отклонения *s* для популяции образца на среднее $\bar{x}$ для этого образца. Вместо RSD, для относительного стандартного отклонения будет использовано обозначение *w*. Таким образом, $w = s/\bar{x}$.

В случае распределения Пуассона *x* вычисляют по формуле

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

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

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

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

Вывод: Если в чашке содержится менее десяти колоний, но не менее четырех, результат вычисляют по методу для общего случая (10.3.2.2) и принимают за результат вычисленное количество микроорганизмов x на см^3 (для жидких продуктов) или на грамм продукта (для прочих продуктов).

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

- «Микроорганизмы присутствуют в количестве менее чем ($4 \times d$) на грамм или см^3».

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

Если чашка с анализируемой пробой (для жидких продуктов) или исходной суспензией (для прочих продуктов) или отобранная из чашек, засеянных материалом первого разведения, не содержит колоний, результат сообщают следующим образом: «Менее $1/d$ микроорганизмов на см^3» (для жидких продуктов) или «менее $1/d$ микроорганизмов на грамм» (для прочих продуктов),

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

10.3.2.4.3 Особые случаи

10.3.2.4.3.1 Общие положения

Эти случаи касаются подсчета типичных и предполагаемых колоний.

10.3.2.4.3.2 Случай 1

Если число типичных и атипичных колоний для чашки с первым разведением d_1 превышает 300 (или какое-либо другое число, установленное в соответствующем стандарте на конкретный метод испытания) с выявленными типичными колониями или подтвержденными колониями, и если чашка, содержащая последующее разведение d_2 содержит менее 300 колоний (или меньше любого другого числа, оговоренного в соответствующем стандарте), и не наблюдается типичных или подтвержденных колоний, результат сообщают следующим образом: «Менее $1/d_2$ и более $1/d_1$ микроорганизмов на см^3» (для жидких продуктов) или «менее $1/d_2$ и более $1/d_1$ микроорганизмов на г» (для прочих продуктов),

где d_1 и d_2 — коэффициенты разбавления, соответствующими разведению d_1 и d_2.

ПРИМЕР — Подсчет дал следующие результаты:

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

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

Результат в пересчете на микроорганизмы будет от 100 до 1000 на см^3 или на г продукта.

10.3.2.4.3.3 Случай 2

Если количество типичных и атипичных колоний в чашке с первым разведением d_1 превышает 300 (или какое-либо другое число, установленное в соответствующем стандарте), среди которых типичных или подтвержденных (идентифицированных) колоний не наблюдается, и если в чашке, содержащей последующее разведение d_2, выявлено менее 300 колоний (или какого-либо другого числа, установленного в соответствующем стандарте) и не выявлено типичных или подтвержденных (идентифицированных) колоний, результат сообщают следующим образом: «Менее $1/d_2$ микроорганизмов на см^3» (для жидких продуктов) или «Менее $1/d_2$ микроорганизмов на г» (для прочих продуктов),

где d_2 — коэффициент разбавления, соответствующий разведению d_2.

ПРИМЕР — Подсчет дал следующие результаты:

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

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

Результат в пересчете на микроорганизмы будет меньше 1000 на см^3 или на г продукта.

10.3.2.5 Метод вычисления: особые случаи

10.3.2.5.1 Если число подсчитанных колоний (общее число колоний, число типичных колоний или число предполагаемых колоний) выше 300 (или какого-либо другого числа, установленного в соответствующем стандарте на конкретный метод испытания) для чашки с первым разведением d_1, а число

(общее, типичных колоний или колоний, соответствующих критериям идентификации) для чашки со вторым последующим разведением d_2 менее 10, то,

- если число колоний для чашки с первым разведением d_1 попадает от 334 до 300 (верхний участок доверительного интервала для средневзвешенного значения равного 300), используют метод вычисления для общих случаев (см. 10.3.2.2);
- если число колоний на чашке с первым разведением d_1 превышает 334 (верхний предел доверительного интервала для средневзвешенного значения, равного 300), учитывают только результат подсчета для разведения d_2 и вычисляют ориентировочное число (см. 10.3.2.4), за исключением случаев, когда максимальное значение для подсчета колоний установлено на значении 300, а ориентировочное количество меньше восьми (нижний предел доверительного интервала для средневзвешенного значения, равного 10), поскольку разность между двумя разведениями будет неприемлемой.

Цифры, соответствующие доверительным интервалам, должны быть привязаны к максимальному количеству, установленному для подсчета колоний.

Пример 1 — Подсчет дал следующие результаты:
- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено 310 колоний;
- во втором выбранном разведении (10^{-3}) выявлено восемь колоний.
Используют метод вычисления для общих случаев, анализируя чашки для двух выбранных разведений.

Пример 2 — Подсчет дал следующие результаты:
- в первом выбранном разведении (10^{-2}) выявлено более 334 колоний на чашку;
- во втором выбранном разведении (10^{-3}) девять колоний.
Ориентировочное число сообщают на основе колоний, подсчитанных в чашке для разведения 10^{-3}.

Пример 3 — Подсчет (если для подсчета колоний установлено максимальное количество равное 300) дал следующие результаты:
- в первом выбранном разведении (10^{-2}) свыше 334 колоний на чашку;
- во втором выбранном разведении (10^{-3}) семь колоний.
Результат данного подсчета неприемлем.

Пример 4 — Подсчет (если для подсчета колоний установлено максимальное число равное 150) дал следующие результаты:
- в первом выбранном разведении (10^{-2}) более 167 колоний на чашку (верхний предел доверительного интервала при средневзвешенном значении равном 150);
- во втором выбранном разведении (10^{-3}) семь колоний.
Сообщают ориентировочное количество на основе колоний, подсчитанных в чашке с разведением 10^{-3}.

10.3.2.5.2 Если количество подсчитанных колоний (общее количество колоний, количество типичных колоний или количество презумптивных колоний) для каждой из чашек всех посеянных разведений дает значение свыше 300 (или любого другого числа, установленного в соответствующем стандарте), результат формулируют следующим образом: «Более 300/d» (в случае общего числа или числа типичных колоний) или «Более 300 х $b/A \times 1/d$» (в случае подтвержденных (идентифицированных) колоний), выраженных в количестве микроорганизмов на см^3 (для жидких продуктов) или в количестве микроорганизмов на г (для прочих продуктов),

где d — коэффициент разбавления последнего посеянного разведения;

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

10.3.2.5.3 Если чашка с последним засеянным разведением содержит от 10 до 300 колоний, то общее количество колоний, количество типичных колоний или количество презумптивных колоний N вычисляют по формуле

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

где c — число колоний, подсчитанных в чашке;

V — объем посевного материала, использованный для каждой чашки, в см^3;

d — выбранное разведение (коэффициент разбавления).

Результат округляют в соответствии с 10.3.2.2.

За результат принимают число N микроорганизмов на см^3 (для жидких продуктов) или на г (для прочих продуктов).

Пример — Подсчет дал следующие результаты:
- в последнем засеянном разведении (10^{-4}) 120 колоний.

Таким образом, $N' = \frac{120}{1 \cdot 10^{-4}} = 1\,200\,000.$

Округление результата производят в соответствии с 10.3.2.2, число N′ микроорганизмов равно 1 200 000 или 1,2 × 10^6 на $см^3$ или на г продукта.

10.3.2.6 Измерение неопределенности

См. ИСО 19036 в отношении количественных определений.

10.4 Подсчет колоний дрожжей и плесеней

10.4.1 Общие положения

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

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

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

10.4.2 Подсчет колоний дрожжей и плесеней

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

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

10.5 Подсчет при использовании жидких сред

10.5.1 Принцип

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

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

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

10.5.2 Посев

10.5.2.1 Общие положения

Если используют селективную питательную среду, добавление образца для анализа не должно уменьшать селективных свойств этой среды (тем самым способствуя росту прочих микроорганизмов). В большинстве стандартов информация о совместимости определенных образцов и жидкой среды описана в области их применения. Необходимо с осторожностью подходить к таким образцам, как специи, какао, бульон и т. д., поскольку они могут содержать подавляющие рост микроорганизмов вещества, в связи с чем требуют добавления нейтрализующих веществ, применения более высоких коэффициентов разведения, центрифугирования, фильтрования или иммуномагнитной сепарации для выделения искомых микроорганизмов из образца, даже если это специально не оговорено в соответствующих стандартах. Несовместимость может также быть вызвана биологическим составом образца: сильно

загрязненные от окружающей среды пробы, ферментированные продукты или продукты, содержащие пробиотики, очевидно представляют большие проблемы микробиологу-аналитику, чем пробы, которые содержат очень незначительное количество микроорганизмов. Для таких проблемных образцов рекомендуется выполнять эксперименты, используя контрольные микроорганизмы, чтобы подтвердить, что метод действительно подходит для анализа данного образца.

10.5.2.2 Проведение анализа

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

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

Если нет иных указаний, время, прошедшее с момента приготовления первого разведения пробы и момента засева последней пробирки, многолуночного планшета или флакона, должно составлять менее 15 мин.

Новую стерильную пипетку следует использовать для каждого разведения.

10.5.3 Выбор способа посева

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

Осуществляют выбор НВЧ из различных существующих конфигураций в соответствии:

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

Неопределенность измерения зависит от числа положительных образцов для анализа, наблюдаемых практически одинаковым образом, поскольку неопределенность подсчета колоний зависит от числа колоний в чашке. Неопределенность измерения увеличивается как функция корня квадратного из числа использованных пробирок. Число пробирок необходимо увеличить в четыре раза для того, чтобы неопределенность измерения уменьшилась вдвое. Если используют способы только с небольшим числом дублируемых пробирок, неопределенность измерения низкая.

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

10.5.3.1 Способ одного разведения

Если ожидаемая концентрация микроорганизмов невелика или ожидается ее умеренное изменение, наиболее подходящим способом посева будет одна серия равных проб для анализа. Там, где ожидаемое соотношение между максимальным и минимальным количеством микроорганизмов менее 25, десять параллельных проб для анализа является наименьшим числом для работы; для 50 параллельных пробирок соотношение 200 является предельным. Примеры НВЧ для одного разведения приведены в таблицах В.1—В.4. приложения В.

10.5.3.2 Способ нескольких разведений

Если концентрация микроорганизмов в пробе неизвестна или предполагается ее значительное изменение, может потребоваться посев на серии пробирок из нескольких разведений. Высевают достаточное число разведений, чтобы обеспечить исследование как с положительными, так и с отрицательными результатами. Число разведений также зависит от метода вычисления, используемого для оценки значения НВЧ. Если требуется применение таблиц, то необходимо получить результаты от трех разведений, а способы посева ограничиваются способами, представленными в соответствующих стандартах. При использовании компьютерных программ число разведений и параллельных пробирок не ограничивается.

10.5.3.3 Симметричный способ посева

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

10.5.3.4 Асимметричный способ

В асимметричных способах используют разное количество пробирок в разных разведениях. Применение таких способов пригодно только для оценки количества микроорганизмов в четко заданном диапазоне. Примеры приведены в ИСО 8199.

10.5.4 Термостатирование (инкубирование)

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

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

Для некоторых микроорганизмов может потребоваться термостатирование в два этапа/или этап подтверждения. В отношении подробностей см. соответствующие стандарты.

10.5.5 Трактовка результатов

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

10.5.6 Определение значений НВЧ

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

10.5.6.1 Математический метод

10.5.6.1.1 Приблизительные формулы для всех случаев

Приблизительные значения НВЧ для любого числа разведений и параллельных пробирок получают путем применения следующей формулы (взятой из ссылки [36]):

$$\text{MPN} = \frac{z_p \cdot m_r}{\sqrt{m_s \cdot m_t}}, \tag{5}$$

где z_p — число положительных пробирок;

m_r — контрольная масса пробы, г;

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

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

НВЧ выражают в пересчете на контрольную массу пробы в граммах (обычно 1 г, иногда 100 г).

10.5.6.1.2 «Точный» раствор для одной серии пробирок

Значение НВЧ для одной серии пробирок выводится по формуле

$$\text{НВЧ} = \frac{m_r}{m_m} \ln\left[\frac{n}{n - z_p}\right], \tag{6}$$

где m_r — контрольная масса пробы, г;

m_m — масса пробы в каждой пробирке серии, г;

ln — натуральный логарифм;

n — число пробирок в серии;

z_p — число пробирок с положительным результатом.

10.5.6.1.3 Показатели точности для анализов одного разведения

Пределы доверительного интервала, при уровне вероятности 95 %, оценки НВЧ можно рассчитать приблизительно, используя следующую формулу

$$x = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[\frac{n}{z_n \pm 2\sqrt{\frac{z(n-z_n)}{n}}} \right], \quad (7)$$

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

m_r — контрольная масса пробы, г;

m_m — масса пробы в каждой пробирке серии, г;

ln — натуральный логарифм;

n — число пробирок в серии;

z_n — число пробирок с отрицательной реакцией.

Знак «плюс» связан с нижним пределом, а «минус» с верхним пределом. Приближение не очень хорошее, если большинство пробирок являются отрицательными (стерильными), однако улучшается по мере возрастания доли положительных пробирок.

10.5.6.1.4 Показатели точности симметричных анализов нескольких разведений

$\log_{10}$ стандартной неопределенности симметричного способа определения НВЧ нескольких разведений можно рассчитать по приближенному равенству Кохрана (Cochran's) [28]

$$SE = 0{,}58\sqrt{\frac{\log_{10} f}{n}}, \quad (8)$$

где SE — стандартная ошибка $\log_{10}$ НВЧ;

f — коэффициент разбавления между последовательными разведениями (обычно 10);

n — число пробирок на разведение.

Верхний и нижний пределы 95 %-ного доверительного интервала можно аппроксимировать соответственно умножением и делением НВЧ на антилогарифм 2 SE. Такое вычисление приводит к завышению верхнего предела.

10.5.6.2 Таблицы НВЧ

10.5.6.2.1 Таблицы для одного разведения

Таблицы В.1—В.4, приложение В, дают значения НВЧ и 95 %-ные доверительные интервалы на образец для анализа для 10, 15, 20 и 25 параллельных пробирок [каждая пробирка засеяна материалом (одного) разведения].

Чтобы подсчитать итог на контрольную массу образца (или объем для жидких образцов), умножают НВЧ и предельные значения 95 %-ного доверительного интервала на отношение (контрольная масса)/[масса пробы для анализа(навески)]. Нельзя умножать на логарифмическую стандартную неопределенность. За контрольную массу в микробиологических исследованиях обычно берется 1 г. Масса образца для анализа (навеска) соответствует количеству образца (в граммах), которое представлено в объеме, использованном для засева пробирок.

Пример — (Ссылка [30])

Двадцать пробирок с бульоном двойной крепости (концентрации) были засеяны аликвотами по 5 см^3 десятикратно разбавленной пробы (0,1 г/5 см^3). После термостатирования 16 пробирок из 20 показали заметный рост. Какова была наиболее вероятная бактериальная плотность (организмов на грамм) в пробе? Таблица В.3 дает значение 1,61 как наиболее вероятное число (НВЧ) организмов на пробирку при нижнем пределе 95 %-ного доверительного интервала, равном 0,93, и верхнем пределе, равном 2,77.

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

MPN = $\frac{1{,}61}{0{,}5}$ на грамм = 3,2 на г со следующим 95 %-ным доверительным интервалом:

нижний предел 95 %-ного доверительного интервала = $\frac{0{,}93}{0{,}5}$ на грамм = 1,9 на грамм;

верхний предел 95 %-ного доверительного интервала = $\frac{2{,}77}{0{,}5}$ на грамм = 5,5 на грамм.

10.5.6.2.2 Таблицы для нескольких разведений: три последовательных разведения

Для симметричных способов общей практикой является использование трех последовательных разведений с тремя (таблица В.5) или пятью параллельными пробирками (таблица В.7) в каждом разведении. Записывают число положительных пробирок для каждого набора пробирок, и по таблице НВЧ для

использованного способа посева подсчитывают наиболее вероятное число (НВЧ) микроорганизмов, присутствующих в контрольном объеме образца.

Некоторые комбинации положительных пробирок встречаются чаще, чем другие. Например, комбинация положительных пробирок 0, 0, 3 встречается гораздо реже комбинации 3, 2, 1. Чтобы выразить количественно эту вероятность, все комбинации положительных результатов классифицируют по категориям от 0 до 3. Результат категории 1 является результатом с более высокой вероятностью, тогда как результат категории 3 более редкий и его сложно воспроизвести. Наиболее худшим вариантом являются результаты категории 0; эти результаты рекомендуется принимать с большим сомнением. Предполагая, что результаты анализа верны, можно ожидать, что 95 % из наблюдаемых комбинаций попадут в категорию 1, в категорию 2—4 %, в категорию 3—0,9 % и только 0,1 % в категорию 0. Категории поясняются в таблице В.6.

В варианте, где используется более трех разведений, выбор «правильной» комбинации трех последовательных разведений не всегда очевиден. Однако выбор можно легко сделать путем записи всех возможных комбинаций положительных пробирок и выбора соответствующей категории по таблице В.5.

После этого применяют следующие правила:

1) Выбирают комбинации трех последовательных разведений, имеющих профиль категории 1, чтобы получить индекс MPN. Если получится более одной комбинации, имеющей профиль категории 1, используют ту комбинацию, которая имеет самое большое число положительных пробирок.

2) Если не имеется комбинации, имеющей профиль категории 1, используют комбинацию, имеющую профиль категории 2. Если имеется несколько комбинаций, имеющих профиль категории 2, используют ту комбинацию, которая имеет самое большое число положительных пробирок.

3) Если не имеется комбинации, имеющей профиль категории 2, используют комбинацию, имеющую профиль категории 3. Если получено несколько комбинаций, имеющих профиль категории 3, используют ту комбинацию, которая имеет самое большое число положительных пробирок.

Некоторые примеры показаны в таблице 1.

Таблица 1 — Примеры выбора положительных результатов при расчете значения НВЧ

Проба	Количество положительных пробирок среди трех термостатированных при следующих количествах пробы, засеянной в каждую пробирку [a]						НВЧ [b]	
							Жидкий продукт ($см^{3-1}$)	Прочие продукты ($г^{-1}$)
Вид продукта	Жидкий продукт:	10 $см^3$	1 $см^3$	10^{-1} $см^3$	10^{-2} $см^3$	10^{-3} $см^3$	—	—
	Прочие продукты:	1 г	10^{-1} г	10^{-2} г	10^{-3} г	10^{-4} г	—	—
1		3	3	2	1	0	$1{,}1 \times 10^1$	$1{,}1 \times 10^2$
2		3	3	3	0	0	$2{,}4 \times 10^1$	$2{,}4 \times 10^2$
3		2	2	1	1	0	7,4	$7{,}4 \times 10^1$
4		3	3	0	0	0	2,4	$2{,}4 \times 10^1$
5		2	2	0	1		$2{,}1 \times 10^{-1}$	2,1

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

10.5.6.3 Компьютерные программы

Наиболее универсальные компьютерные программы не ставят ограничений относительно числа разведений и параллельных пробирок или симметрии системы НВЧ. Анализатор НВЧ (MPN Assay Analyzer) является доступной программой, разработанной на базе предшествующей (см. ссылку [29]).

10.5.7 Обработка результатов

По индексу НВЧ в таблице В.5 находят [согласно комбинации трех (или пяти) выбранных последовательных разведений] наиболее вероятное число (НВЧ) микроорганизмов в контрольном объеме.

Результаты представляют как наиболее вероятное число (НВЧ) микроорганизмов (или специфических групп микроорганизмов) на грамм или на миллилитр. Масса контрольного объема может быть представлена в г или $см^3$ (например 100 г или 100 $см^3$).

11 Метод выявления (качественный метод)

11.1 Общие положения

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

11.2 Принцип

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

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

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

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

Выбор колоний для подтверждения должен охватывать репрезентативные типы сомнительных колоний.

11.3 Измерение неопределенности

Оценка неопределенности измерения качественных анализов разрабатывается ИСО/ТК 34/ПК 9.

12 Метод идентификации (подтверждения)

12.1 Общие положения

Для биохимического и серологического подтверждения используют только чистые культуры.

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

12.2 Приготовление чистой культуры

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

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

12.3 Окрашивание по Граму (модифицированный метод Хаккера)

12.3.1 Общие положения

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

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

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

12.3.2 Растворы

12.3.2.1 Общие положения

Допускается использовать имеющиеся в продаже готовые растворы.

В таком случае следуют рекомендациям изготовителя.

12.3.2.2 Раствор кристаллического фиолетового

12.3.2.2.1 Состав:

кристаллический фиолетовый — 2,0 г;

этиловый спирт (95 %) — 20 $см^3$;

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

вода — 80 $см^3$.

12.3.2.2.2 Приготовление

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

12.3.2.3 Раствор йода

12.3.2.3.1 Состав:

йод —1,0 г;

йодистый калий (KI) — 2,0 г;

вода — 100 $см^3$.

12.3.2.3.2 Приготовление

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

12.3.2.4 Раствор сафранина

12.3.2.4.1 Состав:

сафранин — 0,25 г;

этиловый спирт (95 %) — 10 $см^3$;

вода — 100 $см^3$.

12.3.2.4.2 Приготовление

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

12.3.3 Техника окрашивания

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

Стекло под наклоном осторожно промывают в течение нескольких секунд водой.

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

Стекло под наклоном осторожно промывают водой в течение нескольких секунд.

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

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

Высушивают стекло.

12.3.4 Оценка результатов

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

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

Примечание — Плотные скопления клеток могут давать нетипичную картину окрашивания.

12.4 Использование биохимических наборов для идентификации

Можно использовать имеющиеся биохимические наборы для идентификации изолированных колоний.

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

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

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

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

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

12.5 Применение нуклеиновых зондов для идентификации

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

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

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

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

12.6 Серологические методы

12.6.1 Общие положения

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

12.6.2 Реакция агглютинации на предметном стекле

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

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

Имеющиеся в продаже готовые антисыворотки бывают двух типов:

поливалентная антисыворотка, которая реагирует с микроорганизмами конкретного вида или с группами сероваров (серотипов бактериальной клетки) и которая пригодна для предварительной идентификации;

специфичные моноклональные антитела, применение которых позволит идентифицировать конкретный серовар.

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

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

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

12.6.3 Реакция латекс-агглютинации

Более быстрый метод можно выполнить с имеющимися в продаже наборами, с применением частиц латекса, покрытых специфичными для группы бактерий антителами, например для Escherichia coli O157 см. стандарт ИСО 16654 или Staphylococcus aureus в ИСО 6888). Антиген в экстракте испытывают против ряда латексных реактивов.

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

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

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

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

13 Протокол испытания

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

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

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

Если необходимо, в протокол испытания следует включать измерение неопределенности в соответствии с ИСО 19036.

14 Валидация (обоснованность) микробиологических методов

14.1 Валидация (обоснованность) стандартных методов

Валидация стандартных методов рассматривается Техническим комитетом ИСО/ТК 34/ПК 9.

14.2 Валидация (обоснованность) альтернативных методов

В стандарте ИСО 16140 описан технический протокол и валидация альтернативных методов по стандартным методам.

14.3 Валидация (обоснованность) собственных методов

Валидация собственных методов исследуется Техническим комитетом ИСО/ТК 34/ПК 9.

15 Обеспечение качества результатов /контроля качества исполнения

15.1 Внутренний контроль качества

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

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

Эта программа может включать:

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

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

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

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

15.2 Референс-штаммы (справочные или эталонные штаммы)

См. ИСО 11133 в отношении сохранения справочных штаммов.

15.3 Внешний контроль качества (оценка качества сторонней организацией)

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

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

Приложение А
(справочное)

Свойства некоторых дезинфицирующих веществ

Таблица А.1

Дезинфицирующие вещества	Активно против							Неактивно против					Токсичность		
	Грибы	Бактерии		Микро-бактерии	Споры	Липоидные вирусы	Нелипо-идные вирусы	Белок	Природные материалы	Синтети-ческие материалы	Жесткая вода	Детер-гент	Кожа	Глаза	Легкие
		Грам+	Грам–												
Гипохлориты	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
Спирты	–	+++	+++	+++	–	+	V	+	+	+	+	–		+	
Формальдегид	+++	+++	+++	+++	+++[a]	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Глутаральдегид	+++	+++	+++	+++	+++[b]	+	+	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++
Йодофоры	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	–

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

Приложение В
(справочное)

Определение наиболее вероятного числа (НВЧ)

Т а б л и ц а В.1 — Значения НВЧ на пробу для анализа и пределы 95 %-ного доверительного интервала для серии из 10 пробирок, рассчитанные в соответствии со ссылкой [29]

Число положительных пробирок	Серия из 10 пробирок			
	НВЧ	Стандартная неопределенность $\log^{10}$ НВЧ	95 %-ный доверительный интервал	
			Нижний предел	Верхний предел
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

Т а б л и ц а В.2 — Значения НВЧ на пробу для анализа и пределы 95 %-ного доверительного интервала для серии из 15 пробирок, рассчитанные в соответствии со ссылкой [29]

Число положительных пробирок	Серия из 15 пробирок			
	НВЧ	Стандартная неопределенность $\log^{10}$ НВЧ	95 %-ный доверительный интервал	
			Нижний предел	Верхний предел
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

Т а б л и ц а В.3 — Значения НВЧ на пробу для анализа и пределы 95 %-ного доверительного интервала для серии из 20 пробирок, рассчитанные в соответствии со ссылкой [29]

Число положительных пробирок	Серия из 20 пробирок			
	НВЧ	Стандартная неопределенность $\log^{10}$ НВЧ	95 %-ный доверительный интервал	
			Нижний предел	Верхний предел
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

Т а б л и ц а В.4 — Значения НВЧ на пробу для анализа и пределы 95 %-ного доверительного интервала для серии из 25 пробирок, рассчитанные в соответствии со ссылкой [29]

Число положительных пробирок	Серия из 25 пробирок			
	НВЧ	Стандартная неопределенность $\log^{10}$ НВЧ	95 %-ный доверительный интервал	
			Нижний предел	Верхний предел
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 доверительные пределы (при уровне вероятности 95 %) при использовании трех навесок 1 г ($см^3$), трех навесок 0,1 г ($см^3$) и трех навесок 0,01 г ($см^3$)

Число положительных результатов			Индекс НВЧ[a]	Категория[b]	Доверительный интервал при уровне вероятности 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: ссылка [27].
[b] См. таблицу В.6.
[c] Доверительные пределы, приведенные в данной таблице, предназначены только для того, чтобы дать некоторые представления о влиянии на результаты статистических отклонений. Обычно имеют место и другие источники изменчивости, которые иногда могут быть значительными.

Таблица В.6 — Пояснение классификации результатов

Категория[a]	Определение
1	Найденное наиболее вероятное число (НВЧ) соответствует количеству бактерий в пробе с наибольшей вероятностью. Шанс получения результата менее вероятного, чем наименее вероятный из результатов данной категории, составляет 5 %
2	Найденное наиболее вероятное число (НВЧ) соответствует количеству бактерий в пробе с меньшей вероятностью, чем даже в случае наименее вероятного из результатов категории 1, однако шанс получения результата менее вероятного, чем наименее вероятный из результатов данной категории, составляет не более 1 %
3	Найденное наиболее вероятное число (НВЧ) соответствует количеству бактерий в пробе с меньшей вероятностью, чем даже в случае наименее вероятного из результатов категории 2, однако шанс получения результата менее вероятного, чем наименее вероятный из результатов данной категории, составляет не более 0,1 %
0	Найденное наиболее вероятное число (НВЧ) соответствует количеству бактерий в пробе с меньшей вероятностью, чем даже в случае наименее вероятного из результатов категории 3. В данной категории шанс получения безошибочного результата составляет не более 0,1 %
[a] До начала испытания необходимо принять решение о приемлемости той или иной категории, например 1; 1 и 2 или даже 1, 2 и 3. Если на основе результатов принимается достаточно важное решение, следует признавать только результаты категории 1 или самое большее — категории 1 и 2. Результаты категории 0 следует принимать с большой осторожностью.	

Таблица В.7 — Значения НВЧ на грамм пробы и доверительные пределы при уровне вероятности 95 % (если используют пять навесок по 1 г, пять по 0,1 г и пять по 0,01 г)

Число пробирок, давших положительную реакцию			НВЧ (на г)	Доверительные пределы при уровне вероятности 95 %	
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

Число пробирок, давших положительную реакцию			НВЧ (на г)	Доверительные пределы при уровне вероятности 95 %	
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	—	—

Приложение С
(справочное)

Сведения о соответствии национальных стандартов Российской Федерации ссылочным международным стандартам

Таблица С.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 835:2007	ГОСТ 29230—91 (ИСО 835-4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные
ИСО 6887-1:1999	ГОСТ 26669—85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов
ИСО 6887-2:2003	ГОСТ Р 51448—99 (ИСО 3100-2—88) Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований
ИСО 6887-3:2003	*
ИСО 6887-4:2003	*
ИСО 8199:2005	*
ИСО 8261:2001	ГОСТ 9225—84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа
ИСО/ТС 11133-1:2009	ГОСТ Р ИСО 11133-1:2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 1. Общие правила по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории
ИСО/ТС 11133-2:2003	ГОСТ Р ИСО 11133-2—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие положения по приготовлению и производству питательных сред. Часть 2. Практические руководящие положения по определению эффективности питательных сред
ИСО/ТС 16140:2003	ГОСТ Р ИСО 16140—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол для оценки альтернативных методов
ИСО 22174:2005	ГОСТ Р 52833—2007 Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения
* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.	

Библиография

[1] EN 1659:1996 Системы для диагностики in vitro. Культуральные среды для микробиологических целей. Термины и определения

[2] EN 12322:1999 Средства медицинские для диагностики in vitro. Культуральные среды для микробиологических целей. Критерии эффективности культуральных сред

[3] ИСО 8402:1994 Управление качеством и обеспечение качества. Словарь[1)]

[4] Bell, C. Neaves, P. and Williams, A.P. Food microbiology and laboratory practice, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK (2005)

[5] ISO 9001 Системы менеджмента качества. Общие требования

[6] EA-Guidelines for the use of computers and computer systems in accredited laboratories, European cooperation for Accreditation (1998)

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

[8] 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)

[9] AS 1766, Австралийские стандартные методы микробиологических исследований пищевых продуктов. Часть 1. Современные общие приемы и методики

[10] Buttiaux, R., Beerens, H. and TacQuet, A. Manuel de techniques bactériologiques, Éditions Médicales Flammarion (4th edn.)

[11] 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

[12] Cruickshank et al., Medical microbiology, Vol. 2, 12th edn., Churchill-Livingstone, Edinburgh (1975)

[13] D'Aoust, J.Y. Psychrotrophy and foodborne Salmonella. Int. J. Food. Microbiol. 1991, 13, pp. 207—16

[14] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and McDonald, C. Recovery of Salmonella spp. from refrigerated pre-enrichment cultures of dry food composites, J. AOAC Int. 1995, 78, pp. 1322—7

[15] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Greco, P. Detection of Salmonella in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures: summary of collaborative study. J. AOAC. Int. 1994, 77, pp. 1490—1

[16] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Greco, P. Detection of Salmonella in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures — Interlaboratory study, J. AOAC. Int. 1993, 76, pp. 814—21

[17] 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

[18] 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

[19] Muir, G.D., ed. Hazards in the chemical laboratory, Royal Institute of Chemistry, London (1971)

[20] Laboratory biosafety manual, WHO, Geneva, 1993

[21] Lightfoot, N.F., Maier, E.A. (eds). Microbiological analysis of food and water — Guidelines for quality assurance. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1998)

[22] Harrigan, W.F. and McCance, M.E. Laboratory methods in food and dairy microbiology, Academic Press (1976)

[23] Laboratory safety at the Centers for Disease Control (CDC), NHEW Publication No. CDC 79—8118, Atlanta, 1979

[24] Laboratory safety at the Centers for Disease Control, US Dept of Health, Education and Welfare (Public Health Service), Atlanta, 1979

[25] Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costillow, R.N., Nester, E.W., Krieg, N.R. and Phillips, G.B. eds. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC 20006 (1981)

[26] 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

[1)] Заменен на ИСО 9000:2005.

[27] Microbiological testing laboratory accommodation guidelines, National Association of Testing Authorities, Australia

[28] Microorganisms in foods — 1: Their significance and methods of enumeration, ICMSF, University of Toronto Press (1968 update)

[29] 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)

[30] De Man, J.C. MPN tables (corrected), Eur. J. Appl. Biotechnol. 1983, 17, pp. 301—5

[31] Cochran, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the «Most Probable Number». Biometrics 1950, 6, pp. 105—16

[32] Hurley, M.A. and Roscoe, M.E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series, J. Appl. Bacteriol. 1983, 55, pp. 159—64

[33] Niemela, S. Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Report No. 1, 2nd edition (1983)

[34] Taylor, J. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series, J. Appl. Bacteriol. 1962, 25, pp. 54—61

[35] Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9 th edn., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1994)

[36] Krieg, N.R. and Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology — Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984)

[37] 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

[38] Kreger-van Rij, N.J.W. The yeasts — A taxonomic study, 3rd edn., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands

[39] Thomas, H.A. Bacterial densities from fermentation tube tests, J. Am. Water Works Assoc. 1942, 34, pp. 572—6

[40] ISO/IEC Guide 43-1 Проверка квалификации путем межлабораторных сличений. Часть 1. Разработка и применение программ проверок компетентности лабораторий

[41] ISO 6888 (все части) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета коагулазаположительных стафилококков (Staphylococcus aureus и другие виды)

[42] ISO 9998 Качество воды. Методика оценки и контроля микробиологической среды для подсчета колоний при оценочных испытаниях качества воды

[43] ISO/TP 13843 Качество воды. Руководство по валидации микробиологических методов

[44] ISO 14461-1 Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 1. Оценка работы аналитика при подсчете числа колоний

[45] ISO 14461-2 Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 2. Определение достоверности подсчета числа колоний при посеве на параллельных чашках Петри с последующими стадиями разведения

[46] ISO 16654 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения палочки Escherichia coli O157

[47] ISO/IEC 17025:2005 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

[48] EN 12469 Биотехнология. Критерии качества для боксов биологической безопасности

[49] ISO 17604 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Отбор проб для микробиологического анализа из туши

[50] ISO 18593 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальные методы отбора проб с поверхностей с помощью контактных пластинок и тампонов

[51] ISO Guide 99:1996 Международный словарь по метрологии. Основные и общие понятия и соответствующие термины (VIM)

[52] 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

УДК 576.8:006.354 ОКС 07.100.30 Н09 ОКСТУ 9209
9210

Ключевые слова: пищевые продукты, корма, микробиологические исследования, отбор проб, испытуемые пробы, пипетки, чашки Петри, агар, культуральные среды, колонии, оборудование для исследования, общие правила к применению

Редактор *М.И. Максимова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *А.С. Черноусова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Подписано в печать 12.05.2011. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 6,51. Уч.-изд. л. 7,70. Тираж 90 экз. Зак. 351.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru