

МР 02.031-08. Методические рекомендации. Сырье и продукты пищевые. Количественный микробиологический анализ пищевых продуктов НВЧ-методом при использовании автоматического анализатора ТЕМПО

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека · № МР 02.031-08

• Действующий акт

(утв. и введены в действие Роспотребнадзором 30.06.2008)

Примечание

Документ включен в Перечень нормативной документации, разрешенной для использования в государственных ветеринарных лабораториях при диагностике болезней животных, рыб, пчел, а также контроля безопасности сырья животного и растительного происхождения (утв. Россельхознадзором 30.07.2009 № 02-03-48/563).

Утверждаю
Главный врач ФГУЗ
«Федеральный центр
гигиены и эпидемиологии»,
Председатель Лабораторного
совета Федеральной службы
по надзору в сфере защиты
прав потребителей
и благополучия человека
А. И. Верещагин

30 июня 2008 года

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ НВЧ-МЕТОДОМ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА ТЕМПО

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ МР 02.031-08

1. Методические рекомендации разработаны:

ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» ФС Роспотребнадзора
(И.В. Брагина, М.В. Зароченцев, И.В. Новокшонова);

ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» (Н.Я. Салова,
Смирнова И.Ю.);

ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге»
(Гречанинова Т.А., Григорьева Н.С., Лыско Е.П.);

ГУ НИИ Питания РАМН (С.А. Шевелева, Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Быкова, А.В.
Булахов) при участии ООО «БИОМЕРЬЕ», г. Москва (Душкина Т.Н., Дубовая Н.В.).

2. Рекомендованы к утверждению Лабораторным советом Роспотребнадзора
(Протокол № 4 от 30.06.2008).

3. Утверждены и введены в действие Председателем Лабораторного совета,
Главным врачом ФГУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора Верещагиным А.И. 30 июня
2008 г.

4. Введены впервые.

1. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации предназначены для органов
и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества
и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также
мониторинг микробной загрязненности данных объектов; лабораторий других
организаций, аккредитованных в установленном порядке на проведение
контроля качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых
продуктов; организаций, независимо от форм собственности, осуществляющих
производственный контроль продовольственного сырья и пищевых продуктов
в процессе промышленного производства и оборота продукции.

1.2. Настоящие методические рекомендации предназначены для использования при проведении микробиологических исследований с целью количественного учета микроорганизмов различных групп в пищевых продуктах и продовольственном сырье.

2. Общие положения

2.1 Настоящие методические рекомендации распространяются на определение и подсчет количества:

- аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ в 1 г продукта) при температуре (30 +/- 1) °С за 40 – 48 часов в молочных, овощных замороженных продуктах и блюдах общественного питания с диапазоном нормируемых значений КМАФАнМ от 10^4 КОЕ/г и выше; в других продуктах – от 10^1 КОЕ/г и выше, за исключением указанных в п. 2.2,
- бактерий семейства Enterobacteriaceae при температуре (35 +/- 1) °С за 22 – 27 часов в молочных продуктах с диапазоном нормируемых значений от 10^3 КОЕ/г и выше (отсутствие в 0,001 г продукта и менее); в других продуктах – от 10^1 КОЕ/г и выше (отсутствие в 0,1 г продукта и менее), за исключением указанных в п. 2.2,
- колиформных бактерий (БГКП) при температуре (37 +/- 1) °С за 24 часа в молочных продуктах с диапазоном нормируемых значений от 10^3 КОЕ/г и выше (отсутствие в 0,001 г продукта и менее); в других продуктах – от 10^1 КОЕ/г и выше (отсутствие в 0,1 г продукта и менее), за исключением указанных в п. 2.2,
- бактерий Escherichia coli, обладающих ферментом бета-глюкуронидазой, при температуре (37 +/- 1) °С за 24 часа – в пищевых продуктах, за исключением молочных продуктов и указанных в п. 2.2, с диапазоном нормируемых значений от 10^1 КОЕ/г и выше (отсутствие в 0,1 г продукта и менее),
- коагулазоположительных стафилококков при температуре (37 +/- 1) °С за 24 – 27 часов – в пищевых продуктах, за исключением указанных в п. 2.2, с диапазоном нормируемых значений от 10^2 КОЕ/г и выше (отсутствие в 0,01 г продукта и менее).

2.2. Настоящие методические рекомендации не распространяются на исследования напитков безалкогольных, а также продуктов с высокой ферментативной активностью (молоко и сливки-сырые, морепродукты сырые (моллюски), рыба соленая).

3. Сущность методик

3.1. Количественный учет микроорганизмов по технологии ТЕМПО производится по принципу наиболее вероятного числа (НВЧ), путем посева разведений продукта в жидкую питательную среду, автоматически распределяемую по лункам контейнера (карты) ТЕМПО с различной емкостью, инкубирования посевов, регистрации положительных лунок по признакам роста в них микроорганизмов, утилизирующих специфические для каждой исследуемой группы или вида микроорганизмов субстраты с появлением флуоресцентного сигнала.

Подсчет НВЧ искомых микроорганизмов в образце продукта производится системой в автоматическом режиме с учетом комбинации количества и типа (размера) лунок в карте ТЕМПО, показавших положительный результат, а также степени исходного разведения образца с помощью таблицы НВЧ, заложенной в программное обеспечение прибора.

3.1.1. Определение КМАФАнМ (тест ТЕМПО TVC на общее число микробов) основано на измерении способности микроорганизмов продуцировать внеклеточные ферменты. В состав питательной среды входит специфический субстрат, меченый 4-метилумбеллифероном. Во время роста микроорганизмы выделяют в культуральную жидкость ферменты, которые расщепляют субстрат, в результате чего освобождается свободный 4-метилумбеллиферон, обладающий флуоресценцией, при этом количество продуктов реакции прямо пропорционально численности популяции микроорганизмов. Наличие флуоресцентного сигнала считывается и фиксируется в автоматическом режиме ридером.

3.1.2. Определение количества β — глюкуронидаза — позитивных *Escherichia coli* (тест ТЕМПО ЕС) основано на способности 94% штаммов вида *E. coli* продуцировать фермент β — глюкуронидазу. В состав питательной среды ТЕМПО ЕС входит специфический субстрат 4 — метилумбеллиферил — β — *D* — глюкуронид. Во время роста микроорганизмы выделяют в культуральную жидкость β — глюкуронидазу, которая расщепляет субстрат. При этом в питательную среду выделяется свободный 4-метилумбеллиферон, обладающий флуоресцентной способностью. Количество продуктов реакции прямо пропорционально численности популяции исследуемых микроорганизмов. Наличие флуоресцентного сигнала считывается и фиксируется в автоматическом режиме ридером.

3.1.3. Определение количества бактерий семейства Enterobacteriaceae (тест ТЕМПО ЕВ) и колиформ (тест ТЕМПО ТС) основано на способности микроорганизмов изменять рН питательной среды за счет ферментации добавленных углеводов (для определения бактерий семейства Enterobacteriaceae – глюкозы, для колиформ – лактозы). В питательную среду внесен индикатор 4-метилумбеллиферон, флуоресцирующий только при нейтральных значениях рН (≥ 6). В процессе роста и утилизации углеводов, уровень рН снижается прямо пропорционально численности популяции исследуемых микроорганизмов. При достижении средой значений рН ≤ 6 флуоресценция 4-метилумбеллиферона угасает, снижение или отсутствие флуоресцентного сигнала фиксируется ридером как положительный результат.

3.1.4. Определение количества коагулазоположительных стафилококков (тест ТЕМПО СТА) основано на способности микроорганизмов изменять рН питательной среды за счет ферментации добавленных специфических субстратов. В питательную среду внесен индикатор 4-метилумбеллиферон, флуоресцирующий только при нейтральных значениях рН (≥ 6). В процессе роста и утилизации субстратов уровень рН снижается прямо пропорционально численности популяции коагулазоположительных стафилококков. При достижении средой значений рН ≤ 6 флуоресценция 4-метилумбеллиферона угасает, снижение или отсутствие флуоресцентного сигнала фиксируется ридером как положительный результат.

4. Аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды

1. Комплект оборудования (станция) для пробоподготовки посредством разведения образцов пищевых продуктов, инокулирования питательных сред, заполнения и запаивания карт, в который входят <1>:

- 1.1. диспенсеры для разведения питательных сред,
- 1.2. штативы для заполнения карт ТЕМПО (вместимостью 6 карт),
- 1.3. штативы для инкубации и считывания карт ТЕМПО (вместимостью 20 карт),
- 1.4. вакуумная станция для заполнения и запаивания карт (ТЕМПО Filler),
- 1.5. программное обеспечение для пробоподготовки,
- 1.6. компьютер с влагоустойчивой мини-клавиатурой, сканером для штрих-кодов и картой WiFi.

2. Комплект оборудования (станция) для учета результатов посредством считывания карт и интерпретации результатов, в который входят <1>:

2.1. компьютер со сканнером для штрих-кодов и мышью,

2.2. программное обеспечение для учета и обработки результатов,

2.3. программное обеспечение для управления и настройки системы,

2.4. ридер (считывающее устройство) для карт,

2.5. беспроводной WiFi-маршрутизатор,

2.6. принтер.

<1> Рабочие станции обмениваются информацией в режиме реального времени посредством соединения WiFi, даже если находятся в разных комнатах.

3. Контейнеры (карты из 48 лунок разного объема для воспроизведения НВЧ) для культивирования КМАФАнМ (ТЕМПО TVC), E. coli (ТЕМПО ЕС), бактерий семейства Enterobacteriaceae (ТЕМПО EB), колиформных бактерий (ТЕМПО ТС), коагулазоположительных стафилококков (ТЕМПО STA).

4. Пакет ТЕМПО двухсекционный с поперечным фильтром для смешивания образца пищевого продукта с растворителем и для фильтрования образца.

5. Шейкер лабораторный для пробирок типа «Вортекс» для перемешивания компонентов суспензии.

6. Термостат регулируемый с диапазоном рабочих температур от 28 до 40 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью +/- 1 °С.

7. Гомогенизаторы бактериологические ножевого и перистальтического типов (Мастикатор, Стомайкер).

8. Пипетки градуированные, вместимостью 0,1 см³, 1,0 см³ по ГОСТ 20292.

9. Питательные среды стерилизованные сухие во флаконах, для культивирования КМАФАнМ (ТЕМПО TVC), E. coli (ТЕМПО ЕС, г/л: гидролизат соевый ферментативный — 9, ростовые добавки — 0,25, 3-(n-морфолино)-пропансульфоновой кислоты натриевая соль — 20,8, 3-(n-морфолино)-пропансульфоновая кислота — 12,6, натрия дезоксихолат бычий или бараний — 0,7, субстратные и ферментные добавки — 0,19, противопенный агент — 0,4; pH

после восстановления 7,4) бактерий семейства Enterobacteriaceae (ТЕМПО ЕВ), колиформных бактерий (ТЕМПО ТС, г/л: лактоза из коровьего молока – 10, ростовые добавки – 0,25, питательные субстраты (бычий или свиные) – 19, натрия дезоксихолат бычий или бараний – 0,75, флуоресцентный pH-индикатор – 0,06, противопенный агент – 0,4; pH после восстановления 7,3), коагулазоположительных стафилококков (ТЕМПО STA).

10. Вода пептонная, 0,1%.

11. Вода пептонная забуференная, 1%.

12. Буфер калий-фосфатный, pH 7,2 (раствор $KH_2PO_4 \cdot 0,0425\text{г/дм}^3$).

13. Вода дистиллированная стерильная.

14. Водный раствор натрия гидрофосфата двухзамещенного.

15. Оптический стандарт мутности (ОСМ) на 5 единиц.

16. Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) для выращивания и подсчета тест-культур (состав среды (г/л): ферментативный гидролизат казеина – 17,0; пептон соевый – 3,0; натрий хлористый – 5,0; фосфат калия однозамещенный – 2,5; глюкоза – 2,5; дрожжевой экстракт – 6,0; агар – 15,0; pH до автоклавирования 7,3 +/- 0,2, стерилизация при 121 °C в течение 15 мин).

17. Штаммы микроорганизмов для тестирования сходимости результатов методик – *Escherichia coli* $K12F^+$ (ВКПМ), *Escherichia coli* шт. 25922 (ATCC), *Escherichia coli* шт. 8739 (ATCC), *Staphylococcus aureus*, шт. 906 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

18. Шпатели Дригальского стеклянные или металлические.

5. Отбор и подготовка проб

Отбор и подготовку проб пищевых продуктов проводят в соответствии с ГОСТ 26668-85 «Методы отбора проб для микробиологических анализов», ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов», ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96), а также в соответствии с действующими ГОСТ и НД на конкретные виды продуктов.

Масса или объем отбираемых проб должны быть достаточными для проведения испытания и минимально вдвое превышать аналитический образец.

Для микробиологических испытаний пробы отбирают до взятия проб на физико-химические и органолептические испытания стерильным инструментом в стерильную посуду. При этом от образца отбирают несколько точечных проб из разных мест, которые объединяют и перемешивают для составления из них усредненной пробы.

Замороженные продукты предварительно размораживают до температуры внутри продукта 0 – (-1) °С (не менее 1 часа в термостате при температуре 37 °С); продукты, содержащие жиры (сливочное масло, мороженое), нагревают до температуры 40 – 45 °С и перемешивают.

Отобранные пробы тщательно перемешивают и при необходимости асептично измельчают при использовании гомогенизатора ножевого типа (или режущего инструмента) или доводят до однородной консистенции по ГОСТ 26669-85, из измельченного гомогената составляют навеску необходимой массы.

Для продуктов, имеющих $pH < 7$, для предотвращения снижения pH питательных сред, после приготовления суспензии ее нейтрализуют стерильным раствором двууглекислого натрия с массовой концентрацией 100 г/дм³ (из расчета 1 см³ раствора на каждые 10 см³ взвеси исследуемого продукта) и тщательно перемешивают.

6. Подготовка к испытанию

Растворители, дистиллированную воду и буферные растворы подвергают стерилизации автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 минут. В случае необходимости предварительно доводят pH до 7,2 +/- 0,2 с помощью 0,1 н HCl или 0,1 н NaOH.

Подготовленную в соответствии с п. 4 навеску исследуемого продукта жидкой консистенции (гомогената твердого или порошкообразного продукта) в количестве 10 г (см³) асептично вносят в двухсекционный пакет ТЕМРО и смешивают с 90 г (см³) растворителя, выдержанного до температуры 18 – 25 °С. При этом используют любой из растворителей (пп. 6.10, 6.11, 6.12): 0,1% пептонную воду, 1% забуференную пептонную воду, калий-фосфатный буфер, который добавляют к продукту в соотношении 1:9 для получения десятикратного разведения. Для приготовления разведения молочных продуктов используют раствор натрия гидрофосфата двухзамещенного.

Допускается для приготовления разведения использовать навески продуктов другой массы, добавляя в них растворитель также в соотношении 1:9, при этом во всех случаях исходное разведение образца должно составлять 1:10 (например, 25 г продукта и 225 г растворителя).

Содержимое пакета гомогенизируют при помощи гомогенизатора типа Мастикатор или Стомайкер.

7. Проведение испытания

7.1. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Готовят необходимое количество флаконов со средой, из расчета один флакон на один образец. Флаконы выдерживают до достижения комнатной температуры.

Заполняют диспенсер стерильной дистиллированной водой и устанавливают на объем 3,9 см³, для получения второго последующего разведения 1:400. Удаляют воздух из трубок подачи жидкости и носика, слив две первых порции растворителя.

Одновременно готовят к работе станцию пробоподготовки ТЕМПО, подключая к сети для прогрева.

Следуя инструкциям программного обеспечения компьютера из комплекта станции пробоподготовки, вносят данные об образце (вручную с клавиатуры или с помощью сканера).

Порцию стерильной дистиллированной воды объемом 3,9 см³ асептически вносят во флакон с питательной средой TVC при помощи диспенсера для растворения среды.

Из секции пакета ТЕМПО, содержащей профильтрованный образец, стерильной пипеткой отбирают 0,1 см³ суспензии и переносят во флакон со средой. Содержимое флакона гомогенизируют в течение трех секунд на гомогенизаторе типа «Вортекс». Объем полученной суспензии должен составлять 4,0 см³.

Готовят одну карту TVC для каждого флакона с суспензией, при этом отслеживают, чтобы цветовая маркировка карты и флакона совпадали.

Связывают номер образца со штрих-кодами соответствующих карт и флакона при помощи сканера для штрих-кодов станции пробоподготовки, следуя инструкциям программного обеспечения станции пробоподготовки.

Флакон с суспензией помещают в штатив для заполнения карт. Карту помещают в соответствующую прорезь и асептически вставляют транспортную трубочку во флакон со средой, не дотрагиваясь до кончика транспортной трубочки во избежание контаминации. Штатив рассчитан максимально на шесть флаконов и позволяет одновременно заполнять от 1 до 6 карт ТЕМПО.

Штатив для заполнения карт помещают в вакуумную станцию для заполнения карт и запускают цикл заполнения. Суспензия из флакона автоматически полностью засасывается в карту. После заполнения транспортные трубочки срезаются и утилизируются, а карты запаиваются. Все операции в станции заполнения карт выполняются станцией автоматически и должны составлять не более трех минут. Цикл заполнения одинаков для всех карт и всех разведений, что позволяет одновременно заполнять разные карты.

После удаления штатива для заполнения карт из вакуумной станции визуально проверяют полноту заполнения (флаконы от питательных сред должны быть пусты). Карты вынимают из штатива для заполнения и выгружают в штатив для инкубации и считывания. Карты вставляют в прорези таким образом, чтобы штрих-код карты был обращен к ручке штатива, в каждый штатив допускается вставлять не более 20 карт, вставлять карты между прорезями нельзя. Карты инкубируют в термостате при температуре 30 ± 1 °C в течение (44 ± 4) °C часов.

7.2. Определение количества колиформных бактерий (БГКП)

Готовят необходимое количество флаконов со средой ТС, из расчета один флакон на один образец. Флаконы выдерживают до достижения комнатной температуры.

Заполняют диспенсер стерильной дистиллированной водой и устанавливают на объем 3,0 см³, для получения второго последующего разведения 1:40. Удаляют воздух из трубок подачи жидкости и носика, слив две первых порции растворителя.

Одновременно готовят к работе станцию пробоподготовки ТЕМПО, подключая к сети для прогрева.

Следуя инструкциям программного обеспечения компьютера из комплекта станции пробоподготовки, вносят данные об образце (вручную с клавиатуры или с помощью сканера).

Порцию стерильной дистиллированной воды объемом 3,0 см³ асептически вносят во флакон с питательной средой ТС при помощи диспенсера для растворения среды.

Из секции пакета ТЕМПО, содержащей профильтрованную суспензию образца, стерильной пипеткой отбирают 1 см³ суспензии и переносят во флакон со средой. Содержимое флакона гомогенизируют в течение трех секунд на гомогенизаторе типа «Вортекс». Объем полученной суспензии должен составлять 4,0 см³.

Готовят одну карту ТС для каждого флакона с суспензией, отслеживая, чтобы цветовая маркировка карты и флакона совпадали.

Связывают номер образца со штрих-кодами соответствующих карт и флакона при помощи сканера для штрих-кодов станции пробоподготовки, следуя инструкциям программного обеспечения станции пробоподготовки.

Флакон с суспензией помещают в штатив для заполнения карт. Карту помещают в соответствующую прорезь и асептически вставляют транспортную трубочку во флакон со средой, не дотрагиваясь до кончика транспортной трубочки во избежание контаминации. Штатив рассчитан максимально на шесть флаконов и позволяет одновременно заполнять от 1 до 6 карт ТЕМПО.

Штатив для заполнения карт помещают в вакуумную станцию для заполнения карт и запускают цикл заполнения. Суспензия из флакона автоматически полностью засасывается в карту. После заполнения транспортные трубочки срезаются и утилизируются, а карты запаиваются. Все операции в станции заполнения карт выполняются станцией автоматически и должны составлять не более трех минут. Цикл заполнения одинаков для всех карт и всех разведений, что позволяет одновременно заполнять разные карты.

После удаления штатива для заполнения карт из вакуумной станции визуально проверяют полноту заполнения (флаконы от питательных сред должны быть пустыми). Карты вынимают из штатива для заполнения и выгружают в штатив для инкубации и считывания. Карты вставляют в прорези таким образом, чтобы штрих-код карты был обращен к ручке штатива, в каждый штатив допускается

вставлять не более 20 карт, вставлять карты между прорезями нельзя. Карты инкубируют в термостате при температуре (36 +/- 1) °C в течение 23 +/- 1 часов.

7.3. Определение количества *Escherichia coli*

Данный метод не предназначен для обнаружения β – глюкуронидаза – дефицитных разновидностей *E. coli*, в частности, таких, как диареегенные энтерогеморрагические *E. coli* группы EHEC (серотип *E. coli* 0157:H7 и т.п.).

Готовят необходимое количество флаконов со средой ЕС, из расчета один флакон на один образец. Флаконы выдерживают до достижения комнатной температуры.

Заполняют диспенсер стерильной дистиллированной водой и устанавливают на объем 3,0 см³, для получения второго последующего разведения 1:40. Удаляют воздух из трубок подачи жидкости и носика, сливая две первых порции растворителя.

Одновременно готовят к работе станцию пробоподготовки ТЕМПО, подключая к сети для прогрева.

Следуя инструкциям программного обеспечения компьютера из комплекта станции пробоподготовки, вносят данные об образце (вручную с клавиатуры или с помощью сканера).

Порцию стерильной дистиллированной воды объемом 3,0 см³ асептически вносят во флакон с питательной средой ЕС при помощи диспенсера для растворения среды.

Из секции пакета ТЕМПО, содержащей профильтрованную суспензию образца, стерильной пипеткой отбирают 1 см³ суспензии и переносят во флакон со средой. Содержимое флакона гомогенизируют в течение трех секунд на гомогенизаторе типа «Вортекс». Объем полученной суспензии должен составлять 4,0 см³.

Готовят одну карту ЕС для каждого флакона с суспензией, отслеживая, чтобы цветовая маркировка карты и флакона совпадали.

Связывают номер образца со штрих-кодами соответствующих карты и флакона при помощи сканера для штрих-кодов станции пробоподготовки, следуя инструкциям программного обеспечения станции пробоподготовки.

Флакон с суспензией помещают в штатив для заполнения карт. Карту помещают в соответствующую прорезь и асептически вставляют транспортную трубочку во флакон со средой, не дотрагиваясь до кончика транспортной трубочки во избежание контаминации. Штатив рассчитан максимально на шесть флаконов и позволяет одновременно заполнять от 1 до 6 карт ТЕМПО.

Штатив для заполнения карт помещают в вакуумную станцию для заполнения карт и запускают цикл заполнения. Суспензия из флакона автоматически полностью засасывается в карту. После заполнения транспортные трубочки срезаются и утилизируются, а карты запаиваются. Все операции в станции заполнения карт выполняются станцией автоматически и должны составлять не более трех минут. Цикл заполнения одинаков для всех карт и всех разведений, что позволяет одновременно заполнять разные карты.

После удаления штатива для заполнения карт из вакуумной станции визуально проверяют полноту заполнения (флаконы от питательных сред должны быть пустыми). Карты вынимают из штатива для заполнения и выгружают в штатив для инкубации и считывания. Карты вставляют в прорези таким образом, чтобы штрих-код карты был обращен к ручке штатива, в каждый штатив допускается вставлять не более 20 карт, вставлять карты между прорезями нельзя. Карты инкубируют в термостате при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 23 ± 1 часов.

7.4. Подсчет бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

Готовят необходимое количество флаконов со средой ЕВ, из расчета: один флакон на один образец. Флаконы выдерживают до достижения комнатной температуры.

Заполняют диспенсер стерильной дистиллированной водой и устанавливают на объем 3,0 см³, для получения второго последующего разведения 1:40. Удаляют воздух из трубок подачи жидкости и носика, сливая две первых порции растворителя.

Одновременно готовят к работе станцию пробоподготовки ТЕМПО, подключая к сети для прогрева.

Следуя инструкциям программного обеспечения компьютера из комплекта станции пробоподготовки, вносят данные об образце (вручную с клавиатуры или с помощью сканера).

Порцию стерильной дистиллированной воды объемом 3,0 см³ асептически вносят во флакон с питательной средой ЕВ при помощи диспенсера для растворения среды.

Из секции пакета ТЕМПО, содержащей профильтрованную суспензию образца, стерильной пипеткой отбирают 1 см³ суспензии и переносят во флакон со средой. Содержимое флакона гомогенизируют в течение трех секунд на гомогенизаторе типа «Вортекс». Объем полученной суспензии должен составлять 4,0 см³.

Готовят одну карту ЕВ для каждого флакона с суспензией, отслеживая, чтобы цветовая маркировка карты и флакона совпадали.

Связывают номер образца со штрих-кодами соответствующих карт и флакона при помощи сканера для штрих-кодов станции пробоподготовки, следуя инструкциям программного обеспечения станции пробоподготовки.

Флакон с суспензией помещают в штатив для заполнения карт. Карту помещают в соответствующую прорезь и асептически вставляют транспортную трубочку во флакон со средой, не дотрагиваясь до кончика транспортной трубочки во избежание контаминации. Штатив рассчитан максимально на шесть флаконов и позволяет одновременно заполнять от 1 до 6 карт ТЕМПО.

Штатив для заполнения карт помещают в вакуумную станцию для заполнения карт и запускают цикл заполнения. Суспензия из флакона автоматически полностью засасывается в карту. После заполнения транспортные трубочки срезаются и утилизируются, а карты запаиваются. Все операции в станции заполнения карт выполняются станцией автоматически и должны составлять не более трех минут. Цикл заполнения одинаков для всех карт и всех разведений, что позволяет одновременно заполнять разные карты.

После удаления штатива для заполнения карт из вакуумной станции визуально проверяют полноту заполнения (флаконы от питательных сред должны быть пустыми). Карты вынимают из штатива для заполнения и выгружают в штатив для инкубации и считывания. Карты вставляют в прорези таким образом, чтобы штрих-код карты был обращен к ручке штатива, в каждый штатив допускается вставлять не более 20 карт, вставлять карты между прорезями нельзя. Карты инкубируют в термостате при температуре (35 +/- 1) °C в течение 22 – 27 часов.

7.4. Подсчет количества *Staphylococcus aureus*

Готовят необходимое количество флаконов со средой STA, из расчета: один флакон на один образец. Флаконы выдерживают до достижения комнатной температуры.

Заполняют диспенсер стерильной дистиллированной водой и устанавливают на объем 3,0 см³, для получения второго последующего разведения 1:40. Удаляют воздух из трубок подачи жидкости и носика, сливая две первых порции растворителя.

Одновременно готовят к работе станцию пробоподготовки ТЕМПО, подключая к сети для прогрева.

Следуя инструкциям программного обеспечения компьютера из комплекта станции пробоподготовки, вносят данные об образце (вручную с клавиатуры или с помощью сканера).

Порцию стерильной дистиллированной воды объемом 3,0 см³ асептически вносят во флакон с питательной средой STA при помощи диспенсера для растворения среды.

Из секции пакета ТЕМПО, содержащей профильтрованную суспензию образца, стерильной пипеткой отбирают 1 см³ суспензии и переносят во флакон со средой STA. Содержимое флакона гомогенизируют в течение трех секунд на гомогенизаторе типа «Вортекс». Объем полученной суспензии должен составлять 4,0 см³.

Готовят одну карту STA для каждого флакона с суспензией, отслеживая, чтобы цветовая маркировка карты и флакона совпадали.

Связывают номер образца со штрих-кодами соответствующих карты и флакона при помощи сканера для штрих-кодов станции пробоподготовки, следуя инструкциям программного обеспечения станции пробоподготовки.

Флакон с суспензией помещают в штатив для заполнения карт. Карту помещают в соответствующую прорезь и асептически вставляют транспортную трубочку во флакон со средой, не дотрагиваясь до кончика транспортной трубочки во избежание контаминации. Штатив рассчитан максимально на шесть флаконов и позволяет одновременно заполнять от 1 до 6 карт ТЕМПО.

Штатив для заполнения карт помещают в вакуумную станцию для заполнения карт и запускают цикл заполнения. Суспензия из флакона автоматически полностью засасывается в карту. После заполнения транспортные трубочки

срезаются и утилизируются, а карты запаиваются. Все операции в станции заполнения карт выполняются станцией автоматически и должны составлять не более трех минут. Цикл заполнения одинаков для всех карт и всех разведений, что позволяет одновременно заполнять разные карты.

После удаления штатива для заполнения карт из вакуумной станции визуально проверяют полноту заполнения (флаконы от питательных сред должны быть пусты). Карты вынимают из штатива для заполнения и выгружают в штатив для инкубации и считывания. Карты вставляют в прорези таким образом, чтобы штрих-код карты был обращен к ручке штатива, в каждый штатив допускается вставлять не более 20 карт, вставлять карты между прорезями нельзя. Карты инкубируют в термостате при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 – 27 часов.

8. Учет результатов анализа и характеристики методик

Перед учетом результатов анализа любой группы или вида микроорганизмов аппаратуру станции для учета результатов включают не позднее чем за 15 минут до считывания, так как это время необходимо для самотестирования станции и подготовки ее к работе. Начало считывания соответствует моменту истечения времени инкубации.

Штатив для инкубации и считывания с проинкубированными картами помещают в ридер. Ридер сканирует штрих-код каждой карты, считывает флуоресценцию в лунках и интерпретирует результат. В процессе учета карты считываются последовательно одна за другой. Связывание образца с типом теста, разведением и полученными результатами происходит автоматически. По окончании теста карты удаляются из штатива для инкубации, помещаются в контейнер и направляются на утилизацию автоклавированием.

После считывания карт, полученные результаты анализируются программным обеспечением. На основе количества положительных лунок, их объема, степени разведения программа рассчитывает результат методом НВЧ в КОЕ/г или КОЕ/см³ исходного образца продукта, который отображается на экране станции учета результатов.

При внесении в карты пищевого продукта в разведении 1:400 прибор обеспечивает подсчет результата в диапазоне контаминации $10^2 - 4,9 \times 10^5$ КОЕ/г, не более.

При внесении в карты продукта в разведении 1:40 прибор обеспечивает подсчет результата в диапазоне контаминации $10 - 4,9 \times 10^4$ КОЕ/г, не более.

При более высоких предполагаемых уровнях контаминации продукта степень второго последующего разведения необходимо изменять в большую сторону.

Доверительные интервалы для установленного методом ТЕМПО НВЧ микроорганизмов в исследуемых продуктах соответствуют представленным в ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) «Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований» (**таблица Б.1**) при подтверждении сходимости результатов (коэффициент R в диапазоне от 0,01 до 1) с методикой подсчета на чашках, используемой в качестве референс-метода.

9. Контроль сходимости результатов

Для контроля сходимости изготовителем анализатора ТЕМПО рекомендуется проведение периодического тестирования качества определений с использованием тест-культур: *Escherichia coli* шт. 25922 (ATCC), *Escherichia coli* шт. 8739 (ATCC), *Staphylococcus aureus*, шт. 906 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича), *Escherichia coli* *K12F⁺* (ВКПМ).

При контроле определения БГКП, бактерий семейства Enterobacteriaceae и/или *E. coli* из суточных культур указанных штаммов, выращенных на триптон-соевом агаре с дрожжевым экстрактом, готовят суспензию в пептонной воде по ОСМ на 5 единиц с плотностью 10^8 КОЕ/мл, на основе которой готовят серию десятикратных последовательных разведений в пептонной воде до уровня 10^2 КОЕ/мл. 1 мл данной суспензии переносят во флакон с соответствующей питательной средой ТЕМПО, предварительно добавив в него 3 мл стерильной дистиллированной воды.

В программу ТЕМПО вносят коэффициент разведения, модифицированный до 1/4 (ввод цифры «4»).

Приготовленной культурой заполняют одну соответствующую карту ТЕМПО, которую после процедуры запаивания и регистрации инкубируют соответственно цели контроля по пп. **7.2, 7.3** или **7.4**.

Одновременно проверяют плотность суспензии, использованной для инокуляции карты ТЕМПО путем посева 0,1 мл суспензии из разведения 10^3 КОЕ/мл на поверхность триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом

в чашках Петри и растирания шпателем. Посевы инкубируют при одинаковых условиях с картами, после чего подсчитывают число выросших колоний.

После считывания карт полученный результат сравнивают с результатом посева на агар в чашках Петри и рассчитывают коэффициент R по формуле:

Результат ТЕМПО (КОЕ/г)

$R = \text{-----} \cdot 10 \times \text{число колоний, выросших на чашке}$

Значение R должно быть в пределах от 0,01 до 1.

При контроле определения *S. aureus* поступают аналогичным образом, используя суточную культуру *Staphylococcus aureus*, шт. 906.

При необходимости контролю подвергается специфичность определения, для чего используются культуры *Pseudomonas aeruginosa* шт. 27853 (ATCC), *Enterococcus faecalis* шт. 29212 (ATCC) или другие гетерологичные культуры искомым микроорганизмам в соответствии с вышеописанной методикой.

Рост гетерологичных культур должен полностью ингибироваться в средах ТЕМПО (в этих случаях программное обеспечение ТЕМПО выдаст результат – «Число микробов < 1 КОЕ/мл»).

10. Международные сертификаты

1. Предлагаемый метод количественного учета гармонизирован с Международными стандартами ISO:

Afnor Validation в соответствии со стандартом EN ISO 16140:2003 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods;

- Сертификат BIO 12/15 – 09/05, референсный метод EN ISO 4833 (Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony count technique) – тест ТЕМПО TVC (ОМЧ);
- Сертификат BIO 12/13 – 02/05, референсный метод ISO 16649-2 (Horizontal method for the enumeration of β – *glucuronidase* positive *Escherichia Coli*) – тест ТЕМПО EC;
- Сертификат BIO 12/21 – 12/06, референсный метод EN ISO 21528-2 (Horizontal method for detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: colony count method) – тест ТЕМПО EB;

- Сертификат BIO 12/17 – 12/05, референсный метод EN ISO 4832 (General guidance for the enumeration of coliforms, Colony-count technique) – тест ТЕМПО ТС (колиформы).
-