

TEMPO® LAB (Lactic Acid Bacteria) Только для микробиологического контроля

Карты для подсчета лактобактерий

Тест TEMPO® LAB (Lactic Acid Bacteria) автоматизированный тест, предназначенный для подсчета лактобактерий в продуктах питания и образцах окружающей среды за 40-48 часов на автоматическом анализаторе TEMPO.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Тест TEMPO LAB предназначен для подсчета лактобактерий в продуктах питания и образцах окружающей среды за 40-48 часов на автоматическом анализаторе TEMPO.

Данный тест был разработан, чтобы достичь уровня эффективности, сопоставимого с NF ISO 15214 (1), и рекомендаций сборника методов микро-биологических исследований продуктов питания Американской ассоциации здравоохранения (American Public Health Association's Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods) (2).

ПРИНЦИП

Тест TEMPO LAB состоит из флакона с питательной средой и карты, специфичных для данного теста. Исследуемый образец вносится в питательную среду. Инокулированная среда вносится в карту и распределяется по всем 48 лункам (лунки имеют различный объем) в станции для заполнения карт TEMPO Filler. Лунки делятся на 3 группы по 16 (маленькие, средние и большие). Объем лунок каждой группы отличается на один логарифм. Таким образом, карта позволяет воспроизвести метод наиболее вероятного числа (3, 4). В станции для заполнения также происходит герметизация (запаивание) карт для предотвращения контаминации в ходе дальнейшей работы.

В ходе культивирования микроорганизмы утилизируют субстрат питательной среды, что приводит к появлению флуоресцентного сигнала, который улавливается ридером TEMPO Reader. В зависимости от количества и размера положительных лунок производится подсчет микроорганизмов в исходном образце методом наиболее вероятного числа.

СОСТАВ НАБОРА (48 ТЕСТОВ):

Карты TEMPO LAB 2 x 24	Готовые к использованию одноразовые карты с транспортной трубочкой.
Питательная среда TEMPO LAB 2 x 24 флакона	Каждый флакон содержит сухую питательную среду для заполнения одной карты. Для растворения в 4 мл.

1 инструкция прилагается к набору. Также инструкцию можно скачать на сайте: www.biomerieux.com/techlib

СОСТАВ СРЕДЫ TEMPO LAB

Расчетный состав после растворения, г/л.

Глюкоза	14
Питательные вещества (бычья и свиные).....	4
Другие питательные вещества.....	12.5
Буферная система и ингибиторы.....	17.4
Субстрат	0.05
Противопензенный агент	0.4

pH 5.7

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В НАБОР

Материалы:

- Пакеты TEMPO с боковым фильтром (bioMérieux Ref. 80 015)
- Лопастной гомогенизатор
- Пипетки на 0.10 мл и 1.0 мл
- Вортекс
- Термостат (регулируемый)

Указанные ниже номера по каталогу bioMérieux даны в качестве примера:

Рекомендованные для продуктов питания первичные разбавители:

- Пептонная вода / Пептонно-солевой разбавитель (90 мл - Ref. AEB611494)
- Забуференная пептонная вода (90 мл - bioMérieux Ref. 42 042)

- Раствор цитрата натрия / раствор двухзамещенного гидрофосфата калия , согласно EN ISO 6887-5 (2010) п. 5.3 (5)
- Вода для разведения Butterfield с фосфатным буфером (6)
- Другой разбавитель, валидированный пользователем как совместимый с системой TEMPO

Первичные разбавители, рекомендованные для забора образцов внешней среды (для тампонов - салфеток):

- Нейтрализующий буфер DIFCO® (Ref. 236210 Neutralizing Buffer для образцов внешней среды)
- Бульон лягиновый, модифицированный (7)
- Другой разбавитель, валидированный пользователем как совместимый с системой TEMPO

Рекомендованные вторичные разбавители:

- Стерильная дистиллированная вода или вода эквивалентной степени очистки, валидированная пользователем

Материалы, рекомендованные для контроля качества:

- Денситометр Densimat (bioMérieux Ref. 99 234)
- Колумбийский агар с барабаньей кровью [COS] (bioMérieux Ref. 43 041)
- Трипказо-соевый агар [TSA] (bioMérieux Ref. 43 011)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для микробиологического контроля.
- Только для профессионального использования.
- Соблюдайте правила надлежащей лабораторной практики (напр., стандарт EN ISO 7218 (9)).
- Данный набор содержит вещества животного происхождения. Сертификат происхождения и/или санитарного состояния животных не гарантирует отсутствия трансмиссивных патогенных агентов. Рекомендуется обращаться с этими веществами как потенциально инфекционными в соответствии с принятыми нормами (не вдыхать, не глотать).
- Не используйте питательные среды в качестве компонентов и сырья для производства.
- Все образцы и инокулированную среду следует рассматривать как инфекционные и обрабатывать соответствующим образом. В течение всей работы должны соблюдаться асептическая техника и обычные меры предосторожности при обращении с бактериальной группой, см. Laboratory biosafety Manual - WHO - Женева - последний выпуск, или, нормативами, принятым в Вашей стране.
- Не используйте реактивы и расходные материалы по истечении срока годности, указанного на этикетке.
- Перед использованием убедитесь в целостности упаковки и содержимого.
- Не используйте среду при наличии комков и других включений, а также конденсата.
- Не используйте карты с видимыми повреждениями.
- Не допускайте непосредственного контакта образца с питательной средой (в сухой форме) до ее растворения.
- Не используйте карты, не запаянные в станции для заполнения карт TEMPO® Filler.
- Карты TEMPO не предназначены для пересева культуры из положительных лунок.
- Не делайте надписей на поверхности лунок и штрих-коде карты.
- Не наклеивайте на карту этикеток.
- Ридер TEMPO Reader, станцию для заполнения карт TEMPO Filler и штативы необходимо регулярно чистить и обеззараживать (см. Руководства Оператора).
- Любые изменения описанной процедуры могут привести к изменению результатов и должны предварительно быть валидированы в Вашей лаборатории. При изменении описанной процедуры компания bioMérieux не несет ответственности за полученные результаты. Кроме того, изменение описанной процедуры может повлечь за собой аннулирование всех гарантийных обязательств.

ХРАНЕНИЕ

- Набор TEMPO LAB следует хранить при 2-25°C.
- Не оставляйте карты под воздействием света (в подставке для карт или на рабочем столе) более чем на 15 суток.
- Избегайте воздействия прямого ультрафиолетового излучения.
- При соблюдении условий хранения все реактивы стабильны до истечения срока годности, указанного на их этикетках.

ОБРАЗЦЫ (ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ)

Типы образцов

Система TEMPO предназначена для анализа различных продуктов питания для людей и кормов домашних животных.

Подготовка

Выдержите первичный и вторичный разбавители до достижения комнатной температуры (18-25°C) (см. список рекомендуемых разбавителей, "Необходимые реактивы и материалы, не включенные в набор").

Соблюдайте правила действующего стандарта ISO [или ВАМ (6), если применимо] для взятия образцов и приготовления исходных растворов. В частности,

- для кислых продуктов: после приготовления раствора доведите его pH до нейтрального (EN ISO 6887-4 п. 8.2) (8).
- для всех ароматических трав, специй, чаев, травяных чаев, которые обладают ингибиторными свойствами, следует использовать степень разведения минимум 1/400 (EN ISO 6887-4 п. 9.5.4.4) (8).

Для приготовления образца разведите его 1/10 (**первичное разведение**) в одном из рекомендованных первичных разбавителей. Например, стерильно внесите 10 г или 10 мл образца в 90 мл пептонной воды. Гомогенизируйте в пакете TEMPO (см. описание подготовки образца в пакете TEMPO в Руководстве Оператора Станции Пробоподготовки TEMPO).

Временной интервал между гомогенизацией первичного разведения и внесением его в карту TEMPO не должен превышать 45 минут, если иное не указано в международном стандарте (9).

ПРИМЕНЕНИЕ

Для получения более подробной информации см. Руководства Оператора к системе TEMPO.

Протокол для достижения уровня эффективности сходного с таковым, получаемым согласно стандарту NF ISO 15214 (1)

Процедура (продукты питания)

Разведение 1/400 - минимальное рекомендованное разведение по умолчанию; используется для подсчета от 100 до 4.9×10^5 КОЕ/г. Разведение 1/40 используется для подсчета от 10 до 4.9×10^4 КОЕ/г; его следует использовать только для продуктов с незначительным общим обсеменением (например, салатные соусы). Для приготовления разведения 1/40 следует использовать только следующие разбавители: пептонная вода / пептонно-солевой разбавитель и вода для разведения Butterfield с фосфатным буфером (см. п. "Ограничения метода").

1. Приготовьте необходимое количество флаконов с питательной средой (один флакон на один образец) и выдержите до достижения комнатной температуры.
2. Установите диспенсер с вторичным растворителем на 3.9 мл и удалите воздух из трубок подачи жидкости и носика, слив две первых порции растворителя.
3. Войдите в программу станции пробоподготовки TEMPO.

4. Следуя инструкциям программного обеспечения, внесите данные об образце (вручную с клавиатуры или при помощи сканера).
5. Внесите во флакон с сухой питательной средой 3.9 мл вторичного растворителя при помощи диспенсера для растворения среды.
6. Пипеткой отберите 0.1 мл образца из секции пакета TEMPO®, содержащей профильтрованный образец, и перенесите во флакон, содержащий растворенную питательную среду. Гомогенизируйте в течение 3 секунд на вортексе. Полученная инокулированная среда (4 мл) соответствует разведению образца 1/400.
7. Приготовьте одну карту для каждого флакона с иннокулированной средой. **Не дотрагивайтесь** до кончика транспортной трубочки. Убедитесь, что цветовая маркировка и аббревиатура карты и флакона совпадают.
8. Свяжите номер образца со штрих-кодами соответствующих флакона и карты при помощи сканера для штрих-кодов станции пробоподготовки, следуя инструкциям программного обеспечения станции пробоподготовки.
9. Поместите флакон с иннокулированной средой в штатив для заполнения карт и карту в слот напротив и осторожно вставьте транспортную трубочку во флакон со средой. Штатив рассчитан максимум на 6 флаконов + карт и позволяет одновременно заполнять 1-6 карт TEMPO.
10. Поместите штатив для заполнения карт в станцию для заполнения карт TEMPO Filler и начните цикл заполнения. Инокулированная среда из флакона полностью всасывается в карту. После заполнения транспортные трубочки срезаются, и карты запаиваются. Все операции в станции заполнения выполняются автоматически, занимая около 3 минут. Цикл заполнения одинаков для всех карт и всех разведений, что позволяет заполнять карты с разными параметрами одновременно.
11. Удалите штатив для заполнения карт из станции TEMPO Filler и визуально проверьте полноту заполнения (флакон должен быть пуст). Выньте карты из штатива для заполнения и загрузите их в штатив для инкубации: вставьте карты в слоты таким образом, чтобы этикетка на карте была обращена к пользователю (ручке штатива). После заполнения карт их следует загружать в различные штативы для инкубации, в зависимости от температуры культивирования. Каждый штатив рассчитан на 20 карт. Не вставляйте карты между слотами.
12. Утилизируйте использованные флаконы и транспортные трубочки.
13. Инкубируйте карты 40-48 часов при $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, для достижения уровня эффективности, сопоставимого со стандартом NF ISO 15214 (1).

Протокол для достижения уровня эффективности, сопоставимого с главой 19 сборника методов микробиологических исследований продуктов питания Американской ассоциации здравоохранения (2)

Выполните пункты с 1 по 12 приведенной выше процедуры и инкубируйте карты 40-48 часов при $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ для получения результата, соответствующего результату протокола подсчета с использованием среды MRS pH 5.5 с инкубацией в анаэробных условиях в течение 72 ± 3 часов при $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Примечание 1: Время инкубации для теста регулируется программным обеспечением TEMPO Read и включает теоретический 15-минутный интервал между считыванием штрих-кода карты и началом инкубации.

Если реальный интервал более 15 минут (он не должен превышать 2 часов), добавочное время следует прибавить к оставшемуся времени инкубации, отображаемому в программном обеспечении TEMPO Read. Учет результата следует производить строго в пределах временного интервала 40-48 часов, авторизованного программным обеспечением.

Примечание 2: Колебания температуры в термостате не должны превышать $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Считывание карт по окончании инкубации

1. Войдите в программу станции учета результатов.
2. Поместите штатив для инкубации с картами, подлежащими считыванию, в ридер. Ридер сканирует штрих-код каждой карты, считывает флуоресценцию в лунках и интерпретирует результат. Связывание образца с типом теста, разведением и полученными результатами происходит автоматически. Вы можете отложить считывание карт TEMPO LAB: перед началом считывания их можно хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$ максимум 48 часов. В этом случае, перед тем, как поместить карты в ридер, выдержите их до достижения комнатной температуры. При этом полученный результат будет содержать сообщение "Карта была прочитана слишком поздно (The card was read too late)". В предназначенному для комментариев поле можно пометить, что перед считыванием карта хранилась в холодильнике.
3. Редактирование результатов: на экране станции учета результатов отображается результат в колоннеобразующих единицах (КОЕ) на грамм или миллилитр исходного продукта, с информацией об образце, параметрами теста и данными анализа.
4. Вы можете распечатать результат, передать его в лабораторную информационную систему (ЛИС), а также просмотреть ранее полученные результаты.
5. По окончании теста удалите карты из штатива для инкубации и сбросьте в контейнер для утилизации.

ОБРАЗЦЫ (ОБРАЗЦЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ)

Типы образцов

Приведенный протокол можно использовать для микробиологического контроля оборудования, рабочих поверхностей, рук персонала. Забор образца следует осуществлять влажными тампонами/губками/салфетками. Принимая во внимание разнообразие образцов внешней среды, данный протокол, а также протокол с любыми изменениями следует утвердить перед использованием.

Подготовка

Сразу после смыва перенесите тампон/губку/салфетку в пробирку, содержащую указанный объем одного из рекомендованных первичных разбавителей. Полученное разведение соответствует первичному разведению образца.

Пример процедуры (образцы внешней среды)

Перенесите тампон в пробирку, содержащую 10 мл первичного разбавителя. Полученное разведение соответствует 1/10 разведению образца (**первичное разведение**). Гомогенизируйте супензию, тщательно прополоскав тампон в разбавителе. Отожмите тампон о стенку пробирки. Рекомендуется использовать разведение образца минимум 1 в 40 для подсчета от 10 до 4.9×10^4 КОЕ на площадь смыва. Величину разведения можно увеличить в зависимости от предположительного уровня контаминации.

1. Приготовьте необходимое количество флаконов с питательной средой (один флакон на один образец) и выдержите до достижения комнатной температуры.
2. Установите диспенсер с вторичным разбавителем на 3 мл и удалите воздух из трубок подачи жидкости и носика, слив две первых порции.
3. Войдите в программу станции пробоподготовки TEMPO®.
4. Следуя инструкциям программного обеспечения, внесите данные об образце (вручную с клавиатуры или при помощи сканера).
5. Внесите во флакон с сухой питательной средой 3 мл вторичного разбавителя при помощи диспенсера для растворения среды.
6. Стерильной пипеткой отберите 1 мл образца из пробирки, содержащей супензию, полученную после смыва, и перенесите во флакон с растворенной питательной средой. Гомогенизируйте на вортексе около 3 секунд. Полученные 4 мл инокулированной среды соответствуют разведению образца 1/40.
7. Измените коэффициент разведения по умолчанию в программном обеспечении TEMPO: введите "40" для задания разведения 1/40.
8. Далее выполните пункты, начиная с 7 и по последний протокола для продуктов питания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

После считывания карт полученные результаты автоматически анализируются программным обеспечением, которое определяет, какие лунки имеют позитивный результат.

На основе количества положительных лунок, по отношению к их объему и степени разведения образца программа рассчитывает результат в КОЕ на грамм или миллилитр исходного образца, используя таблицы метода наиболее вероятного числа.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Реактивы TEMPO проходят систематический контроль качества на различных стадиях производства. Для пользователей, которые хотят провести свои собственные испытания контроля качества, чтобы гарантировать, что метод TEMPO был проведен корректно, рекомендуется использовать следующие штаммы:

Lactobacillus plantarum ATCC® 14917™
Bacillus subtilis ATCC® 6633™

Рекомендуемый протокол:

- Штаммы следует культивировать при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ или $35 \pm 1^\circ\text{C}$, в зависимости от рекомендаций стандарта, используемого в Вашей лаборатории. Культивирование *Lactobacillus plantarum* на колумбийском агаре с бараньей кровью (COS) следует осуществлять в микроаэрофильных или анаэробных условиях.
- Для *Lactobacillus plantarum*, приготовьте супензию 48-часовой культуры, выращенной на колумбийском агаре с бараньей кровью, в пептонной воде плотностью 0.6 единиц МакФарланда, т.е. около 10^8 КОЕ/мл, используя денситометр Densimat (см. п. "Необходимые реактивы и материалы, не включенные в набор"). Для *Bacillus subtilis*, приготовьте супензию 24-часовой культуры, выращенной на трипказо-соевом агаре, в пептонной воде плотностью 1 единица МакФарланда, т.е. около 10^8 КОЕ/мл, используя денситометр Densimat. Приготовьте серию последовательных десятикратных разведений в пептонной воде до 10^3 КОЕ/мл. Для *Lactobacillus plantarum*, перенесите 1 мл полученной супензии во флакон с питательной средой, предварительно добавив в него 3 мл стерильной дистиллированной воды. Для *Bacillus subtilis*, перенесите 1 мл супензии 10^5 КОЕ/мл во флакон с питательной средой, предварительно добавив в него 3 мл стерильной дистиллированной воды.
- Измените коэффициент разведения по умолчанию в программном обеспечении TEMPO: введите "4" для задания разведения 1/4.
- Заполните каждую карту из одного флакона со средой и инкубируйте.
- Параллельно проверьте плотность супензии, использованной для инокуляции карты TEMPO. Распределите 0.1 мл супензии 10^3 КОЕ/мл по поверхности колумбийского агара с бараньей кровью (*Lactobacillus plantarum*) или трипказо-соевого агара (*Bacillus subtilis*), культивируйте как указано выше и подсчитайте колонии.
- После считывания карт сравните полученный результат с результатом, полученным методом подсчета колоний на агаре COS для *Lactobacillus plantarum*, и проверьте наличие роста *Bacillus subtilis* на TSA.

Диапазон ожидаемых результатов:

Штамм *Lactobacillus plantarum*

Рассчитайте отношение R:

$$R = \frac{\text{Результат TEMPO КОЕ/г}}{10 \times \text{кол - во колоний на чашке COS}}$$

Значение отношения R должно находиться в пределах от 0.1 до 10.

Рост штамма *Bacillus subtilis* должен полностью ингибироваться в среде TEMPO LAB (в этом случае программное обеспечение TEMPO выдаст результат: enumeration < 1 CFU/g (обсеменение < 1 КОЕ/г)).

Если полученные значения не совпадают с указанным диапазоном, свяжитесь с представителем bioMérieux. Ответственность пользователя выполнять Контроль качества в соответствии с установленными нормами и правилами.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Неправильное заполнение карты (пустые лунки и/или остатки суспензии во флаконе после заполнения) может привести к получению ложных результатов: напр., при использовании других пакетов для пробоподготовки (п. "Необходимые реагенты и материалы, не включенные в набор").
- Нарушение правил приготовления и хранения образцов может привести к получению ложных результатов.
- **Внимание:** Испытания TEMPO® LAB проводились на большом количестве продуктов питания, кроме безалкогольных напитков. Тем не менее, принимая во внимание разнообразие образцов и процессов производства, пользователям рекомендуется удостовериться, что компоненты исследуемых образцов не влияют на результаты анализа. В частности, на флуоресцентный сигнал может оказывать влияние интенсивная окраска исходного раствора образца (фруктовые пюре, какао): для теста TEMPO LAB рекомендуется разведение таких образцов не менее 1/400.
- Данный тест не следует использовать для подсчета термофильных стартовых культур (заквасок).
- Для некоторых продуктов, в которых содержится большое количество технологической, термофильной молочно-кислой флоры (напр., продуктов, содержащих прессованный плавленый сыр и пр.), возможно получение заниженных результатов при 30°C.
- Для приготовления разведения 1/40 не следует использовать в качестве первичных разбавителей забуференную пептонную воду и раствор двухзамещенного гидрофосфата, калия, поскольку они влияют на pH среды TEMPO LAB.

Для получения более подробной информации см. Руководства Оператора TEMPO.

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Утилизируйте использованные и неиспользованные реактивы, а также любые контаминированные материалы в соответствии с правилами утилизации инфекционных материалов.

Сотрудники лаборатории несут ответственность за утилизацию отходов в соответствии с типом и классом опасности согласно действующим правилам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Standard NF ISO 15214 (1998) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30°C.
2. American Public Health Association (2004) 4th Edition. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods, chapter 19, Acid-Producing Microorganisms, §19.522 Acidified MRS Agar.
3. Cochran W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". (1950) Biometrics 6, 105-116.
4. Woodward R.L. How probable is the most probable number ? (1957) J. Am. Water Works Assoc., 49, 1060,1068.
5. International Standard EN ISO 6887-5 (2010) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 5 : Specific rules for the preparation of milk and milk products.
6. Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 1 "Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate" (April 2003).
7. Bacteriological Analytical Manual Online BAM Media M79 (January 2001).
8. International Standard EN ISO 6887-4 – Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products.
9. International Standard EN ISO 7218 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations.

ТАБЛИЦА СИМВОЛОВ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Символ	Обозначение
REF	Номер по каталогу
	Произведено
	Температурные ограничения
	Использовать до
LOT	Номер партии
	Перед использованием прочтите инструкцию
	Содержимого достаточно для <n> тестов

BIOMERIEUX, логотип BIOMERIEUX и TEMPO являются используемыми, зарегистрированными и/или находящимися в процессе регистрации торговыми марками, принадлежащими компании bioMérieux, одной из дочерних или входящих в ее группу компаний.

Торговая марка ATCC и товарный знак ATCC, а также любые номера по каталогу ATCC – торговые марки компании American Type Culture Collection.

DIFCO является собственностью Difco Laboratories Incorporated Corporation

Любое другое наименование или торговая марка являются собственностью соответствующих владельцев.



bioMérieux SA

376 Chemin de l'Orme
69280 Marcy-l'Etoile - France

RCS LYON 673 620 399
Тел. 33 (0)4 78 87 20 00
Факс 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com