

TOIDU JA LOOMASÖÖTADE MIKROBIOLOOGIA
Horisontaalmeetodid *Enterobacteriaceae* avastamiseks ja
arvuliseks määramiseks
Osa 1: *Enterobacteriaceae* avastamine ja arvuline
määramine eelrikastusega MPN meetodiga

Microbiology of food and animal feeding stuffs
Horizontal methods for the detection and enumeration of
Enterobacteriaceae
Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with
pre-enrichment
(ISO 21528-1:2004)

EESTI STANDARDI EESSÕNA

See Eesti standard

- rahvusvahelise standardi ISO 21528-1:2004 ingliskeelse teksti sisu poolest identne tõlge eesti keelde. Tõlgenduserimeelsuste korral tuleb lähtuda ametlikes keeltes avaldatud tekstidest;
- jõustunud Eesti standardina sellekohase teate avaldamisel EVS Teataja 2011. aasta detsembrikuu numbris.

Standardi on tõlkinud Karin-Tiiu Türk, eestikeelse kavandi ekspertiisi on teinud Tiina Veskus, standardi on heaks kiitnud tehniline komitee EVS/TK 1 „Toiduained“.

Standardi tõlke koostamise ettepaneku on esitanud Põllumajandusministeerium, standardi tõlkimist on korraldanud Eesti Standardikeskus ja rahastanud Põllumajandusministeerium.

See standard on rahvusvahelise standardi ISO 21528-1:2004 eestikeelne [et] versioon. Teksti tõlke on avaldanud Eesti Standardikeskus ja sellel on sama staatus ametlike keelte versioonidega.

This standard is the Estonian [et] version of the International Standard ISO 21528-1:2004. It has been translated by the Estonian Centre for Standardisation. It has the same status as the official versions.

Tagasisidet standardi sisu kohta on võimalik edastada, kasutades EVS-i veebilehel asuvat tagasiside vormi või saates e-kirja meiliaadressile standardiosakond@evs.ee.

ICS 07.100.01 Mikrobioloogia üldiselt

Võtmesõnad: *Enterobacteriaceae* määramine, loomasöödad, mikrobioloogia, MPN meetod, toiduained, toit
Hinnagrupp F

Standardite reprodutseerimise ja levitamise õigus kuulub Eesti Standardikeskusele

Andmete paljundamine, taastekitamine, kopeerimine, salvestamine elektroonsesse süsteemi või edastamine ükskõik millises vormis või millisel teel ilma Eesti Standardikeskuse kirjaliku loata on keelatud.

Kui Teil on küsimusi standardite autorikaitse kohta, võtke palun ühendust Eesti Standardikeskusega:
Aru 10, 10317 Tallinn, Eesti; www.evs.ee; telefon 605 5050; e-post info@evs.ee

SISUKORD

EESSÕNA	IV
SISSEJUHATUS	V
1 KÄSITLUSALA	1
2 NORMIVIITED	1
3 TERMINID JA MÄÄRATLUSED	2
4 PÕHIMÕTE	2
4.1 <i>Enterobacteriaceae</i> avastamine (vaata lisa A)	2
4.2 Arvuline määramine MPN meetodiga (vaata lisa B)	2
5 LAHJENDI, SÖÖTMED JA REAGENT	3
5.1 Lahjendi: puhverdatud peptoonvesi (BPW)	3
5.2 Söötmed	3
6 SEADMED JA KLAASTARVIKUD	6
7 PROOVI VÕTMINE	7
8 KATSEPROOVI VALMISTAMINE	7
9 KATSE KÄIK	7
9.1 Üldine	7
9.2 Avastamise meetod	7
9.3 Arvulise määramise meetod (MPN meetod)	8
9.4 Isoleerimine ja selekteerimine kinnitamiseks	8
9.5 Selekteeritud kolooniate edasikülv	8
9.6 Biokeemilised kinnituskatsed	9
10 TULEMUSTE VÄLJENDAMINE	9
10.1 Kinnitatud positiivsed katseklaasid	9
10.2 Avastamise meetod	9
10.3 Loendamise meetod: kõige tõenäosema arvu arvutamine (MPN)	9
11 TÄPSUS	9
12 KATSEPROTOKOLL	9
Lisa A (normlisa) Avastamismeetodi diagramm	11
Lisa B (normlisa) MPN tehnika diagramm	12

EESSÕNA

ISO (*International Organization for Standardization*) on ülemaailmne rahvuslike standardimisorganisatsioonide (ISO rahvuslike liikmesorganisatsioonide) föderatsioon. Tavaliselt tegelevad rahvusvahelise standardi koostamisega ISO tehnilised komiteed. Kõigil rahvuslikel liikmesorganisatsioonidel, kes on mingi tehnilise komitee pädevusse kuuluvast valdkonnast huvitatud, on õigus selle komitee tegevusest osa võtta. Selles töös osalevad käsikäs ISO-ga ka rahvusvahelised, riiklikud ja valitsusvälised organisatsioonid. Kõigis elektrotehnika standardimist puudutavates küsimustes teeb ISO tihedat koostööd Rahvusvahelise Elektrotehnikakomisjoniga (IEC).

Rahvusvahelised standardid kavandatakse ISO/IEC direktiivide 2. osas esitatud reeglite kohaselt.

Tehniliste komiteede põhiülesanne on rahvusvaheliste standardite koostamine. Tehnilistes komiteedes vastuvõetud rahvusvahelised standardikavandid saadetakse hääletamiseks rahvuslikele liikmesorganisatsioonidele. Avaldamine rahvusvahelise standardina nõuab, et hääletusel osalenud rahvuslikest liikmesorganisatsioonidest kiidaks selle heaks vähemalt 75 %.

Tuleb pöörata tähelepanu võimalusele, et standardi mõni osa võib olla patendiõiguse subjekt. ISO-t ei saa pidada vastutavaks sellis(t)e patendiõigus(t)e väljaselgitamise eest.

ISO 21528-1 esimene väljaanne koos ISO 21528-2-ga tühistab ja asendab järgmised standardid:

- ISO 5552:1997. Meat and meat products — Detection and enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation — MPN technique and colony-count technique;
- ISO 7402:1993. Microbiology — General guidance for the enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation — MPN technique and colony-count technique;
- ISO 8523:1991. Microbiology — General guidance for the detection of Enterobacteriaceae with pre-enrichment.

ISO 21528-1 on koostanud tehnilise komitee ISO/TC 34 „Toiduained“ alakomitee SC 9 „Mikrobioloogia“.

ISO 21528, üldnimetusega „Toidu ja loomasöödade mikrobioloogia. Horisontaalmeetod *Enterobacteriaceae* avastamiseks ja arvuliseks määramiseks“, koosneb järgmistest osadest:

- Osa 1: *Enterobacteriaceae* avastamine ja arvuline määramine eelrikastusega MPN meetodiga
- Osa 2: Kolooniade loendamise meetod.

SISSEJUHATUS

See ISO 21528 osa annab üldjuhised nende toodete uurimiseks, millel puuduvad rahvusvahelised standardid, ja neid tuleb arvestada organisatsioonidel, kes valmistavad ette mikrobioloogilisi katsemeetodeid toidule ja loomasöötadele. Seoses toodete suure mitmekesisusega selles rakendusvaldkonnas ei saa seda horisontaalmeetodit kõigis üksikasjades rakendada teatavatele toodetele ja mõnele teistele toodetele võib osutuda vajalikuks kasutada erinevaid meetodeid. Sellele vaatamata tuleks igal võimalusel püüda rakendada seda horisontaalmeetodit nii palju kui võimalik ja sellest võib kõrvale kalduda ainult sellistel tehnilistel põhjustel, mis on täielikult põhjendatud.

Kui ISO 21528 see osa järgmine kord üle vaadatakse, võetakse arvesse kogu saadaolev informatsioon, mis puudutab selle meetodi rakendamise ulatust ja põhjuseid, miks sellest eri toodete korral kõrvale kalduti.

Katsemeetodite harmoniseerimine ei saa toimuda koheselt ja teatud tootegruppidele võivad juba olemas olla rahvusvahelised standardid ja/või rahvuslikud standardid, mis ei ühti selle horisontaalmeetodiga. Loodetakse, et kui sellised standardid üle vaadatakse, viiakse need vastavusse ISO 21528 selle osaga selliselt, et ainsad lahknemised sellest horisontaalmeetodist on need, mis on vajalikud üksnes hästi põhjendatud tehnilistel põhjustel.

1 KÄSITLUSALA

See ISO 21528 osa määratleb eelrikastusega meetodi *Enterobacteriaceae* määramiseks. See on rakendatav:

- inимtoiduks ja loomasöödaks ettenähtud toodetele ja
- toidu tootmise ja toidu käitlemise valdkonna keskkonnaproovidele.

Arvulisel määramisel arvutatakse kõige tõenäosem arv (MPN) pärast vedelas söötmes inkubeerimist temperatuuril 37 °C (või 30 °C)¹⁾.

Seda meetodit rakendatakse:

- kui otsitavate mikroorganismide puhul eeldatakse kasvuvõime taastamise vajadust enne rikastust ja
- kui otsitav arv eeldatakse olevat vahemikus 1 kuni 100 milliliitri või grammi katseproovi kohta.

Selle ISO 21528 osa rakendatavuse piirang on tingitud meetodi tundlikkuse suurest varieerumisest (vt peatükk 11).

2 NORMIVIITED

Alljärgnevalt nimetatud dokumendid on vajalikud selle standardi rakendamiseks. Dateeritud viidete korral kehtib üksnes viidatud väljaanne. Dateerimata viidete korral kehtib viidatud dokumendi uusim väljaanne koos võimalike muudatustega.

ISO 6887-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

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

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

ISO 7218:1996²⁾. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations

ISO 8261. Milk and milk products — General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination

ISO/TS 11133-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

¹⁾ Üldiselt kasutatakse temperatuuri 37 °C, kui *Enterobacteriaceae* arvu loendatakse hügieeni indikaatorina. Alternatiivina võib valida temperatuuri 30 °C, kui *Enterobacteriaceae* loendatakse tehnoloogilistel eesmärkidel ja see hõlmab sühhotroopset *Enterobacteriaceae*'d.

²⁾ Eesti standardi märkus. Aastal 2007 on jõustunud ISO 7218:2007 (Eestis kehtib EVS-EN ISO 7218:2008, selle eestikeelne versioon on planeeritud avaldada 2012. aasta I kvartalis).

ISO/TS 11133-2:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media

3 TERMINID JA MÄÄRATLUSED

Standardi rakendamisel kasutatakse alljärgnevalt esitatud termineid ja määratlusi.

3.1

Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae)

mikroorganismid, mis moodustavad iseloomulikke kolooniaid violettpunane-glükoos-sapiagaril ja mis fermenteerivad glükoosi ja näitavad negatiivset oksüdaasi reaktsiooni, kui katsed viiakse läbi ISO 21528 selles osas määratletud meetodi kohaselt

3.2

Enterobacteriaceae avastamine (*detection of Enterobacteriaceae*)

nende bakterite olemasolu või puudumise määramine kindlas toote koguses, kui katsed viiakse läbi ISO 21528 selle osa kohaselt

3.3

Enterobacteriaceae arvuline määramine (*enumeration of Enterobacteriaceae*)

Enterobacteriaceae kõige tõenäosema arvu leidmine katseproovi milliliitris või grammis, kui katse viiakse läbi ISO 21528 selles osas määratletud meetodi kohaselt

4 PÕHIMÕTE

4.1 Enterobacteriaceae avastamine (vaata lisa A)

4.1.1 Eelrikastus mitteselektiivses söötmes

Katsekogus külvatakse puhverdatud peptoonvette (BPW), seejärel inkubeeritakse temperatuuril 37 °C (või 30 °C)¹⁾ 18 h ± 2 h.

4.1.2 Rikastamine selektiivses vedelas söötmes

Rikastuspuljongisse [puhverdatud briljantroheline-glükoos-sapipuljong (EE puljong)] külvatakse eelrikastusel saadud kultuuri ning seejärel inkubeeritakse temperatuuril 37 °C (või 30 °C)¹⁾ 24 h ± 2 h.

4.1.3 Isoleerimine ja selekteerimine kinnitamiseks

Selektiivsesse tahkesse söötmesse (violettpunane-glükoos-sapiagar) külvatakse EE puljongis eelrikastatud kultuuri ning seejärel inkubeeritakse temperatuuril 37 °C (või 30 °C)¹⁾. Pärast 24 h ± 2 h kontrollitakse iseloomulike tunnustega eeldatavate *Enterobacteriaceae* kolooniate olemasolu.

4.1.4 Kinnitamine

Eeldatavad *Enterobacteriaceae* kolooniad külvatakse edasi mitteselektiivsele söötmele ja kinnitatakse glükoosi fermenteerimise katsega ja oksüdaasi olemasoluga.

4.2 Arvuline määramine MPN meetodiga (vaata lisa B)

4.2.1 Eelrikastamine mitteselektiivses söötmes

x g katsekogust lisatakse $9 \times$ ml puhverdatud peptoonveele (BPW) ja homogeniseeritakse. BPW-s valmistatakse üks või rohkem 10-kordset lahjendust (vastavalt eeldatavale saastumise tasemele). Esmalahjendusest pipeteeritakse 10 ml igasse kolme katseklaasi. Seejärel lisatakse 3×1 ml esmast lahjendust 9 ml BPW-le ja 3×1 ml igat järgnevat lahjendust lisatakse 9 ml BPW-le. Neid katseklaase inkubeeritakse temperatuuril 37 °C (või 30 °C)¹⁾ 18 h ± 2 h.