



КонсультантПлюс
надежная правовая поддержка

"МУ 2657-82. Методические указания по санитарно-бактериологическому контролю на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами"
(утв. Минздравом СССР 31.12.1982 N 2657)

Документ предоставлен **КонсультантПлюс**

www.consultant.ru

Дата сохранения: 25.08.2015

Утверждены
Заместителем Главного
государственного
санитарного врача СССР
А.И.ЗАИЧЕНКО
31 декабря 1982 г. N 2657

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ
НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ОБЩЕСТВЕННОГО ПИТАНИЯ И ТОРГОВЛИ
ПИЩЕВЫМИ ПРОДУКТАМИ**

МУ 2657-82

Настоящие Методические указания предназначены для использования учреждениями Государственного санитарного надзора.

Методические указания подготовили:

Отдел гигиены питания ГСЭУ МЗ СССР (Л.В. Селиванова).

Институт питания АМН СССР, лаборатория санитарно-пищевой микробиологии (И.Б. Куваева, В.И. Бугрова, С.А. Шевелева).

Санитарно-эпидемиологическая станция г. Москвы, лаборатория санитарной бактериологии (Т.М. Федорова).

ЦОЛИУВ МЗ РСФСР, кафедра гигиены питания (И.А. Карплюк, В.И. Попов).

1. ВВЕДЕНИЕ

Санитарно-бактериологический контроль является ценным вспомогательным методом при санитарном обследовании объектов, дающим возможность объективно оценивать уровень санитарного содержания обследуемых предприятий общественного питания и торговли.

Применение унифицированных методов исследования позволяет получать сравнимые достоверные данные, характеризующие санитарное благополучие отдельного участка предприятия, в целом или ряда предприятий, а также обобщать эти данные.

По результатам санитарно-бактериологических исследований можно судить о соблюдении санитарного режима на предприятии, о возможном нарушении технологии приготовления пищи или условий хранения продуктов, о соблюдении правил личной гигиены персоналом, об эпидемиологической безопасности готовой продукции и др.

Таким образом, санитарно-бактериологический контроль незаменим при проведении санитарных обследований предприятий общественного питания и торговли и поэтому является обязательным для использования в практике повседневной работы санитарно-эпидемиологических станций и ведомственных санитарно-пищевых лабораторий.

2. ОБЩАЯ ЧАСТЬ

2.1. Цели санитарно-бактериологического контроля:

- конечная цель - профилактика пищевых отравлений бактериальной природы и острых кишечных инфекций путем обеспечения выпуска в предприятиях общественного питания и реализации в продовольственных магазинах доброкачественных и безопасных в эпидемическом отношении пищевых продуктов;

- ближайшая цель - выявить причины выпуска на производстве или при реализации в торговой сети продуктов, недоброкачественных или опасных в эпидемическом отношении, и способствовать ликвидации этих причин.

2.2. Принципы оценки результатов санитарно-бактериологического контроля:

- критерием высокого качества санитарной обработки оборудования, посуды, инвентаря и др. служит отсутствие на поверхности обработанных предметов санитарно-показательных, а также патогенных микроорганизмов;

- обнаружение значительной микробной обсемененности готовых продуктов сапрофитной микрофлорой должно расцениваться как показатель санитарного неблагополучия объекта;
- выявление высокой обсемененности готовых продуктов санитарно-показательными микроорганизмами следует расценивать как указание на возможность заражения этих продуктов патогенными микроорганизмами;
- обнаружение патогенных микроорганизмов в готовых выпускаемых или реализуемых продуктах (в определенных количествах продукта) расценивается как показатель эпидемического неблагополучия объекта;
- результаты санитарно-бактериологических исследований следует сравнивать с показателями стандартов или рекомендаций по допустимому уровню обсемененности продуктов микроорганизмами.

2.3. Планирование санитарно-бактериологических исследований.

Санитарно-бактериологические исследования проводятся:

- а) при плановых санитарных обследованиях объектов общественного питания и торговли, осуществляемых в порядке текущего санитарного надзора;
- б) при обследованиях объектов в порядке предупредительного санитарного надзора с целью гигиенической оценки технологической линии производства новых видов пищевых продуктов (блюд); новых типов технологического и торгового оборудования, а также при вводе в эксплуатацию новых или реконструированных предприятий;
- в) при санитарных обследованиях объектов в арбитражном порядке;
- г) по санитарно-эпидемиологическим показаниям <*>;
- д) внеплановые - при санитарных обследованиях предприятий по заданиям вышестоящих организаций и др.

<*> При возникновении пищевых отравлений исследования проводятся в соответствии с действующей "Инструкцией о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях", N 1135-73.

2.4. Объекты санитарно-бактериологического обследования:

- а) готовые блюда, кулинарные изделия, скоропортящиеся и особо скоропортящиеся пищевые продукты в предприятиях общественного питания и торговли;
- б) в отдельных случаях сырье и полуфабрикаты (по ходу технологического процесса - по эпидпоказаниям, при высокой бактериальной обсемененности готовых продуктов, блюд и др.);
- в) оборудование, инвентарь, посуда и др. с целью проверки эффективности санитарной обработки;
- г) смывы с рук, санитарной одежды, личных полотенец (с целью проверки соблюдения правил личной гигиены персоналом);
- д) вода центрального водоснабжения и особенно - местных источников водоснабжения (места водозабора и краны).

2.5. Общий порядок проведения санитарно-бактериологических обследований.

Первоочередному контролю подлежат объекты питания, на которых приготовление пищевых продуктов или отдельные этапы технологического процесса являются наиболее опасными в санитарно-эпидемиологическом отношении, а также предприятия, неблагополучные по санитарно-техническому состоянию. Например, требуют большего внимания объекты, вырабатывающие кулинарные, кондитерские кремовые изделия или другие особо скоропортящиеся пищевые продукты (паштеты, селедочное масло, заливные, студни и др.), также более тщательного наблюдения требуют объекты, находящиеся в неудовлетворительном санитарно-техническом состоянии, затрудняющем нормальную эксплуатацию и поддержание должного санитарного режима на предприятии (неполный набор помещений, недостаточная их площадь, недостаток холодильников, перебои с горячей и холодной водой, плохая работа канализации и т.д.).

В торговой сети первоочередному обследованию, главным образом, подлежат специализированные магазины или секции продовольственных магазинов, реализующие особо скоропортящиеся товары (молоко и молочные продукты, мясные и рыбные кулинарные изделия, кремовые изделия и др.).

Санитарное обследование с отбором проб для лабораторных исследований проводится санитарным врачом или его помощником в присутствии руководителя предприятия или замещающего его лица без

предварительного оповещения.

Результаты исследований отражают качество пищевых продуктов, позволяют выявить нарушения санитарного содержания предприятий, обнаружить уязвимые точки, потенциально опасные в отношении загрязнения продукции, дать ответ на вопрос о причинах и источниках загрязнения продукции, характеризовать уровень санитарной культуры персонала, намечать пути устранения выявленных недостатков.

Каждое обследование оформляется актом в 2-х экземплярах по установленной форме, который подписывается лицом, производящим обследование, и руководителем предприятия.

Результаты каждого обследования должны быть доведены до сведения администрации и персонала предприятия и обсуждены на производственном совещании предприятия не позднее 3-х дней после завершения исследований. Обобщенные результаты лабораторных исследований следует периодически обсуждать на совещаниях в вышестоящих организациях (трестах, столовых, торгах, УРСах) или других организациях, которым подчиняются предприятия.

На основании данных санитарно-бактериологического обследования предприятий администрацией должны быть разработаны конкретные меры по устранению выявленных недостатков с обязательной последующей проверкой санэпидстанциями эффективности проведенных мероприятий.

2.6. Планирование санитарно-бактериологического контроля.

План проведения санитарно-бактериологического контроля предприятий общественного питания и торговли должен составляться санитарными врачами оперативных отделений СЭС совместно с лабораторными работниками. При планировании устанавливается количество объектов, подлежащих санитарно-бактериологическому контролю, кратность их обследования - с учетом возможностей лаборатории <*>. Санитарно-бактериологические обследования должны проводиться в соответствии с утвержденными графиком, при этом для обследуемых объектов должен сохраняться принцип внезапности. Рекомендуемая кратность планового обследования предприятий:

<*> Кратность обследования может изменяться в зависимости от общего числа пищевых объектов, подконтрольных данной СЭС, значимости объектов, эпидобстановки и др., но не реже, чем указано в "Нормативах проведения основных санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды" (методические указания), М., 1983. Утв. МЗ СССР, N 2671-83.

а) в теплое время года (при температуре наружного воздуха +10 град. С и более):

- благополучные объекты - 1 раз в месяц для предприятий общественного питания и 1 раз в 2 месяца для предприятий торговли;

- эпидзначимые (неблагополучные) - 2 раза в месяц для предприятий общественного питания и 1 раз в месяц для предприятий торговли;

б) в холодное время года (при температуре наружного воздуха ниже +10 град. С):

- благополучные объекты - 1 раз в 2 месяца для предприятий общественного питания и 1 раз в 4 месяца для предприятий торговли;

- эпидзначимые объекты - 1 раз в месяц для предприятий общественного питания и 1 раз в 2 месяца для предприятий торговли.

2.7.1. Отбор проб пищевых продуктов и смывов для санитарно-бактериологических исследований.

Отбор проб и смывов должен производиться санитарным врачом или помощником санитарного врача. В необходимых случаях отбор проб и смывов целесообразно производить совместно с работниками лаборатории, чтобы обеспечить правильность их проведения.

При отборе проб пищевых продуктов, методики исследования которых предусмотрены соответствующими ГОСТ, ОСТ, ТУ и СТ СЭВ, следует руководствоваться указаниями раздела "отбор проб", а в случае отсутствия - специальным стандартом по правилам отбора проб и настоящими Методическими указаниями, а кроме того, учитывать конкретные обстоятельства на обследуемом объекте.

Перед выемкой проб продуктов представитель санэпидстанции должен ознакомиться с имеющейся на данную партию продукта документацией (накладные, сертификаты и т.п.); произвести наружный осмотр всей партии, обращая внимание на состояние тары (исправность, деформации, загрязнение и т.п.); внешний вид продукта; условия хранения (реализации) и транспортировки. При обнаружении неисправности тары, могущей повлиять на качество продукта, следует производить вскрытие каждой

неисправной единицы упаковки (за исключением случаев, оговоренных в стандартах).

После осмотра партии производится вскрытие отдельных единиц упаковки и выемка проб для органолептического исследования на месте и для исследования в лаборатории.

Количество единиц упаковки, подлежащих вскрытию, устанавливается действующими стандартами, ОСТ, ТУ и т.п. на соответствующие продукты.

При осмотре продуктов, на которые стандарты или ТУ отсутствуют, вскрывают до 5% единиц упаковки от общего их количества в партии, но не менее 5 единиц.

В процессе отбора проб составляется акт отбора проб по установленной форме (N 342-у - для пищевых продуктов, N 344-у - для кулинарных изделий), в котором указывается: дата и час взятия проб, точное наименование обследуемого предприятия, место и точка отбора (участок, цех, рабочее место и т.п.), подробное описание взятой пробы и т.д.

Составляется точное направление на исследование по форме N 378-у.

2.7.2. Отбор проб готовых блюд на предприятиях общественного питания и продуктов, реализуемых в торговой сети.

Исследованию подлежат следующие готовые блюда и продукты:

а) холодные блюда:

- винегреты и салаты из вареных овощей и фруктов;
- мясные и рыбные студни, заливные;
- печеночные и мясные паштеты;
- масло селедочное, сырное и с др. наполнителями;
- холодные мясо и рыба;
- мясная и рыбная кулинария;

б) первые холодные блюда:

- окрошки;
- ботвинья, свекольник и др.;

в) вторые горячие блюда:

- изделия из мясного или рыбного фаршей (котлеты, биточки, шницели, тефтели и др.);
- изделия из мелко нарезанного мяса (гуляш, рагу, азу и др.);
- изделия из субпродуктов;

г) гарниры (к вторым горячим блюдам):

- макаронные изделия отварные;
- овощные и др. гарниры;

д) третьи блюда:

- компоты из сухих и свежих фруктов, кисели;
- сбитые сливки, муссы, желе и т.п.;
- напитки, изготовленные в предприятиях общественного питания;

е) кондитерские изделия с кремом;

ж) бульоны;

з) продовольственные товары:

- молоко и молочные продукты (кефир, сливки, сгущенное молоко, мороженое, сметана, творог, творожная масса);

- сыры сычужные и плавленые;
- колбасные изделия, особенно вареные, ливерные и субпродуктовые, свинокочености;
- рыбные продукты (икра), рыбная гастрономия;
- овощи квашеные;
- яичный порошок, яичный меланж;
- напитки минеральные, безалкогольные, слабоалкогольные, пиво;
- вина бочковые и в оригинальной упаковке;
- жиры: масло сливочное, топленое, маргарин;
- кондитерские изделия (карамель, пастила, мармелад, печенье);
- желатина.

Исследования горячих блюд проводятся для определения остаточной микрофлоры с целью проверки эффективности термической обработки, а также вторичного обсеменения в процессе реализации. Исследования холодных блюд проводят для определения общего количества микроорганизмов, титра

бактерий группы кишечных палочек - с целью установления вторичного обсеменения в процессе приготовления или реализации этих блюд.

Оценка качества особо скоропортящихся пищевых продуктов и блюд по результатам бактериологических анализов производится в соответствии с "Временными рекомендациями по микробиологическим нормативам для ряда особо скоропортящихся пищевых продуктов и методам их исследования", утвержденными Минздравом СССР 30 декабря 1981 г. за N 2510-81.

2.7.2.1. Отбор проб пищевых продуктов при обследовании технологического процесса производства.

Если по результатам бактериологических исследований установлено, что отдельные блюда, пищевые продукты оказываются систематически обсемененными санитарно-показательными микроорганизмами, то проводят санитарно-бактериологическое обследование производства данного блюда или продукта по ходу технологического процесса, чтобы установить этап, на котором происходит обсеменение продукта микрофлорой. Целесообразно параллельно с отбором проб продуктов на разных этапах технологического процесса делать смывы с оборудования, инвентаря и посуды, с которыми соприкасался продукт.

Например, при обследовании процесса приготовления салата или винегрета бактериологическому исследованию подвергаются все исходные компоненты, входящие в состав блюда, по этапам их обработки: вареные овощи - после их охлаждения и очистки, далее - после измельчения; вареное мясо - после охлаждения, после измельчения; исследуется также зеленый горошек и др. компоненты блюда. Затем берут пробу блюда после перемешивания всех компонентов, но без заправки и квашеных овощей. Заправку исследуют отдельно. Одновременно производятся смывы с инвентаря и оборудования, разделочных досок, ножей, крышки стола, овощерезок, посуды, рук работников холодного цеха.

2.7.2.2. Техника отбора проб.

Для отбора проб продуктов и блюд в лаборатории заготавливаются стерильные банки, закрытые двумя слоями бумаги и обвязанные бечевкой, стерильные ложки, стерильные пинцеты и ножи, завернутые в бумагу.

Пробы продуктов рекомендуется отбирать вдвоем с привлечением в качестве помощника представителя обследуемого учреждения. Помощник в одной руке держит банку, другой - по мере необходимости открывает крышку. В это время лицо, отбирающее пробу, разворачивает требующуюся ложку или пинцет, берет материал и переносит в банку. При необходимости отбора пробы от большого куска отрезают часть его с помощью стерильного ножа и пинцета.

Если проба блюда берется в раздаточной, то в банку переносят с тарелки всю порцию; если образец отбирают на производстве от большой массы продукта (из кастрюли, от большого куска мяса), то берут пробу весом около 200 г, жидкие блюда - после тщательного перемешивания; плотные - из разных мест в глубине куска. Напитки минеральные, безалкогольные, слабоалкогольные и пиво отбирают в количестве 1 бутылки заводской упаковки и 200 мл напитка, изготовленного на предприятии.

2.7.3. Санитарно-бактериологический контроль методом исследования смывов.

В практике текущего санитарного надзора за объектами общественного питания, торговой сети, пищеблоками детских, дошкольных и подростковых учреждений, а также буфетами-раздаточными лечебно-профилактических учреждений (в том числе санаториев, домов отдыха и др.) широко используется метод смывов с целью контроля эффективности санитарной обработки инвентаря, оборудования, посуды, санитарной одежды и рук персонала. Метод смывов дает возможность объективно оценить санитарное содержание обследуемых учреждений.

При проведении санитарно-бактериологических исследований смывов в основном ограничиваются выявлением бактерий группы кишечных палочек, обнаружение их расценивают как одно из подтверждений нарушения санитарного режима.

При выявлении вторичного массивного обсеменения готового продукта со значительным превышением в нем общего количества микробов в смывах также необходимо определять общую бактериальную обсемененность и наличие бактерий рода *Proteus* и *St. aureus*.

Особое внимание при проведении смывов уделяют контролю оборудования и аппаратуры, которые используются по ходу технологического процесса приготовления продуктов, не подвергающихся в дальнейшем тепловой обработке (холодный цех).

Бактериологический контроль методом смывов с поверхностей инвентаря, оборудования, рук и санитарной одежды персонала может преследовать две цели:

а) установить эффективность санитарной обработки, для этого смывы с инвентаря, оборудования, рук и санитарной одежды персонала производят перед началом работы или, если это невозможно, в перерывах, после того как руки и оборудование подверглись санитарной обработке, т.е. смывы производят с чистых объектов. Кроме того, смывы с рук берутся у персонала после посещения туалета до возобновления работы;

б) определить роль оборудования и рук персонала в бактериальном обсеменении продукта или готового блюда по ходу технологического процесса производства, обращая особое внимание на производство продуктов и готовых блюд, прошедших термическую обработку или употребляемых в пищу без предварительной обработки (некоторые овощи, гастрономические продукты, салаты, винегреты и др.). Для решения поставленной задачи одновременно со взятием смывов отбирают повторные пробы пищевых продуктов (смывы берутся с необработанных рук и поверхностей).

Количество подконтрольных объектов, кратность их обследования, количество доставляемых смывов определяются не только мощностью лаборатории, конкретными условиями каждой санэпидстанции, но и эпидситуацией, которая может иметь решающее значение.

В случае необходимости более подробного санитарно-бактериологического обследования отдельных участков производства, например проверки качества мытья столовой посуды и приборов, режима приготовления блюд, взятие проб и смывов производится по специальной программе, составленной для каждого конкретного объекта. Непосредственно на предприятии при каждом обследовании устанавливают конкретные точки для взятия смывов. При повторных обследованиях следует брать смывы с тех же объектов и по возможности в те же часы.

При взятии смывов с оборудования, инвентаря, посуды, столовых приборов записывается: номер образца по порядку, место взятия смыва, в каком техническом и санитарном состоянии находилось оборудование (инвентарь, посуда и т.п.), с которого взят смыв.

При взятии смывов с рук записывается: номер по порядку, фамилия, имя и отчество сотрудника, выполняемая работа (профессия и участок работы).

Составляется акт о взятии смывов в 2-х экземплярах, подписывается лицом, отобравшим пробы, и представителем администрации предприятия. 1 экземпляр акта оставляется на объекте. Результаты исследования доводятся до сведения руководителя предприятия в течение 5 дней.

2.8. Доставка проб.

Доставка проб должна производиться в термokonтейнерах (с охлаждаемыми вкладышами).

Время доставки проб продуктов и смывов в лаборатории для осуществления исследования не должно превышать 2-х часов, так как затягивание этого срока отражается на достоверности результатов анализа.

3. ТЕХНИКА ВЗЯТИЯ СМЫВОВ

При взятии смывов необходимо пользоваться следующими рекомендациями:

1) Из оборудования следует обращать внимание на разделочные доски, мясорубки, производственные столы для готовой пищи, особенно в цехе приготовления холодных закусок. Смывы в цехах производства кондитерских кремовых изделий производят в соответствии с "Методическими указаниями по проведению санитарно-бактериологических исследований на предприятиях, вырабатывающих кондитерские кремовые изделия", М., 1976.

2) Смывы с рук, с санитарной одежды, полотенец берутся в основном у работников, имеющих дело с продукцией, не подвергающейся в дальнейшем тепловой обработке (персонал кухни, холодного цеха, раздатчицы, буфетчицы, официанты, продавцы). Порядок определен [разделом 2.7.3, п. "а"](#).

3) Смывы с крупного оборудования и инвентаря берут с поверхности в 100 кв. см, для ограничения поверхностей используют шаблон (трафарет), сделанный из проволоки, металлической пластинки. Трафарет имеет площадь 25 кв. см, чтобы взять смывы с площади в 100 кв. см, его накладывают 4 раза в разных местах поверхности контролируемого объекта.

4) При взятии смывов с мелких инструментов обтирается вся поверхность предмета, при заборе смывов с тарелок протирают всю внутреннюю поверхность. При взятии смывов с мелких предметов одним тампоном протирают три одноименных объекта - три тарелки, три ложки и т.п. У столовых приборов протирают их рабочую часть.

5) При исследовании стаканов протирают внутреннюю поверхность и верхний наружный край стакана на 2 см вниз.

6) При взятии смывов с рук протирают тампоном ладонные поверхности обеих рук, проводя не менее 5 раз по каждой ладони и пальцам, затем протирают межпальцевые пространства, ногти и подногтевые пространства.

7) При взятии смывов с санитарной одежды протирают 4 площадки по 25 кв. см - нижнюю часть каждого рукава и 2 площадки с верхней и средней частей передних пол спецовки. С различных мест полотенца берут 4 площадки по 25 кв. см.

Взятие смывов производится с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов. Стерильные ватные тампоны на стеклянных, металлических или деревянных палочках, вмонтированных в пробирки с ватными пробками, заготавливают заранее в лаборатории. В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном наливается (в условиях бокса над горелкой) по 5 мл стерильного 0,1% водного раствора пептона или изотонического раствора хлорида натрия таким образом, чтобы ватный тампон не касался жидкости.

Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняют наклоном пробирки или опусканием тампона в жидкость. В процессе отбора смывов рекомендуется неоднократное смачивание тампонов.

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

При плановом санитарно-бактериологическом контроле пищевых продуктов подлежат исследованию:

- количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ) - (общее количество микробов) <*>;

<*> Общее количество микробов не определяют в продуктах, содержащих специфическую микрофлору: кисломолочных продуктах, заправленных салатах, винегретах с квашеными овощами, поскольку подсчет бактерий в таких случаях не может быть показательным.

- количество бактерий группы кишечных палочек (БГКП) <*>, а в части продуктов - количество БГКП методом наиболее вероятного числа (НВЧ);

<*> В тех случаях, когда коли-титр меньше 1, целесообразно характеризовать обсемененность исследуемого жидкого продукта в виде коли-индекса.

- коагулазоположительные стафилококки (*St. aureus*);

- бактерии рода *Proteus*;

- бактерии рода *Salmonella* в 25 г продукта.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ), количество бактерий группы кишечных палочек, *St. aureus* и *Proteus* определяют нижеизложенными методами. Исследование на отсутствие или наличие сальмонелл проводится в соответствии с действующей "Инструкцией о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях", N 1135-73.

Содержание или отсутствие в определенной массе исследуемого продукта вышеперечисленных микроорганизмов должно соответствовать нормативам, изложенным во "Временных указаниях по микробиологическим нормативам для ряда особо скоропортящихся пищевых продуктов и методам их исследования", N 2510-81. При наличии ГОСТа на методы бактериологического анализа (например, ГОСТ 9958-81 "Изделия колбасные и продукты из мяса") анализ проводят в соответствии с ГОСТ, а для оценки качества продуктов пользуются "Временными указаниями", N 2510-81.

В тех случаях, когда по ГОСТу используется для анализа навеска продукта, превышающая норматив (например, в ГОСТ 9958-81 бактерии группы кишечных палочек в зельцах определяют в 1 г, а во "Временных указаниях", N 2510-81, норматив для зельца белого I с и серого II с - отсутствие БГКП в 0,5 г), то делается заключение о соответствии качества продукции по микробиологическим показателям, если БГКП не обнаруживаются в 1 г продукта.

Если БГКП обнаруживают в 1 г, то бактериолог СЭС имеет право сделать посев навески массой 0,5 г.

При разработке ГОСТов на негостированную продукцию общественного питания и пересмотре действующей нормативно-технической документации необходимо руководствоваться методами, изложенными в настоящих "Методических указаниях".

4.1. Подготовка проб пищевых продуктов к бактериологическому исследованию.

Пищевые продукты подразделяются по физическим свойствам на плотные и жидкие, следовательно, и способы обработки их перед исследованием должны быть различными. Перед исследованием пробы вначале подготавливают навеску, которая должна охарактеризовать всю доставленную пробу. Навески продукта берут в условиях бокса стерильно из разных мест пробы, с поверхности и из глубины.

Подготовка навески проб пищевых продуктов, на которые имеется ГОСТ на методы исследования, осуществляется в соответствии с требованиями последних.

Для продуктов, не имеющих ГОСТ на методы исследования (вторые блюда, гарниры, каши, винегреты), отбирают навеску в количестве 15 г на технических весах 1 класса из усредненной пробы.

Навеску плотных продуктов растирают в стерильной фарфоровой ступке с песком или гомогенизируют в микроразмельчителе тканей с постепенным добавлением 135 мл 0,1% раствора пептона в воде или изотонического раствора хлорида натрия и оставляют при комнатной температуре на 15 минут. Затем для посевов взвесь отбирают стерильной пипеткой с широким концом. Принимается, что 1 мл приготовленной взвеси содержит 0,1 г исходного продукта.

Продукты жидкой консистенции - молоко, компоты, напитки, изготовленные в объектах общественного питания, засевают без предварительной обработки; пищевые продукты, имеющие кислую реакцию (рН 4,0 - 6,0), перед исследованием нейтрализуют стерильным 10% раствором двууглекислого натрия до слабощелочной реакции (рН 7,2 - 7,4). Реакцию среды проверяют с помощью рН-метра или по универсальной индикаторной бумаге.

Для исследования на сальмонеллы из усредненной пробы отбирается отдельная навеска массой 25 г.

4.2. Приготовление разведений пищевых продуктов для посева.

Для пищевых продуктов жидкой и полужидкой консистенции, не требующих предварительного размельчения и растирания, разведения готовят следующим образом:

Берут ряд пробирок (обычно не более 5-ти), каждая пробирка должна содержать 9,0 мл стерильного 0,1% раствора пептона или изотонического раствора натрия хлорида. В первую пробирку стерильной градуированной пипеткой вносят 1,0 мл исследуемого продукта, затем новой стерильной пипеткой после весьма тщательного перемешивания содержимое 1-й пробирки в количестве 1 мл переносят в следующую пробирку, не прикасаясь к поверхности жидкости в этой пробирке и т.д.

В результате исследуемый продукт оказывается разведенным в 10, 100, 1000 и более раз в соответствии с количеством взятых пробирок. 1 мл взвеси в первой пробирке содержит 0,1 г (мл) продукта (1-е разведение), во второй пробирке - 0,01 г (мл) продукта (2-е разведение) и так далее.

При исследовании пищевых продуктов плотной консистенции в качестве первого разведения используют 10-процентную взвесь, полученную после механической обработки продукта в ступке или гомогенизаторе, описанным выше способом (п. 4.1).

4.3. Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 г (мл) продукта (Общее микробное число - ОМЧ) - "МАФАНМ".

Метод основан на способности мезофильных аэробов и факультативных анаэробов расти на питательных средах определенного состава при температуре 30 град. С с образованием колоний, видимых при увеличении в 2 раза.

Для определения количества мезофильных бактерий следует выбирать разведения, при посеве которых на чашках вырастает не менее 30 и не более 300 колоний.

Из каждой пробы делают посев глубинным методом на 2 параллельные чашки Петри из 2 - 3 последовательных разведений в количестве 1,0 мл, используя для этого 2-процентный агар, приготовленный из сухого питательного агара. Контролировать температуру надежнее и проще, если агар разливают небольшими порциями в пробирки (12 - 15 мл). Агар в пробирках быстрее расплавляется и охлаждается более равномерно до нужной температуры. Чашки заливают расплавленным и остуженным до 45 град. С агаром сразу же после внесения материала. В противном случае может наблюдаться неравномерное распределение колоний в виде отдельных скоплений в толще агара; для более равномерного распределения посевного материала, кроме того, содержимое чашки перемешивают вращательными движениями.

После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат дном вверх, инкубируют по рекомендации ФАО/ВОЗ при 30 град. С в течение 72 часов; при необходимости предварительный учет производят через 48 часов. Количество колоний подсчитывается на каждой из засеянных чашек. Счет

колоний на чашках производят с помощью прибора для счета колоний бактерий или лупы. Для лучшей видимости считают колонии на темном фоне (под чашку кладут темную бумагу), чашки помещают дном вверх. Каждую колонию отмечают на дне чашки чернилами или тушью.

При подсчете придерживаются следующих правил:

а) если на чашке выросло небольшое количество колоний, примерно 100, подсчитывают все колонии;

б) если колонии распределены равномерно и их количество измеряется несколькими сотнями (200 - 300 колоний), допускается подсчет колоний не менее чем на 1/3 площади чашки. В этих случаях дно чашки делят карандашом на 6 секторов и считают колонии в 3 секторах. Затем делают пересчет на всю площадь чашки: вычисляют среднее количество колоний на площади одного сектора и полученное количество колоний на одном секторе умножают на 6;

в) если на чашке вырастает более 300 колоний, они распределены равномерно и не представляется возможным повторить анализ, то, применяя прибор для счета колоний бактерий, подсчитывают 10 полей зрения площадью по 1 кв. см в разных местах чашки. Полученные числа складывают и выводят среднее арифметическое. Чтобы высчитать количество колоний на всей чашке, полученное среднее число

умножают на площадь чашки (πR^2). Обычно диаметр чашки равен 8,5 - 10 см, $\pi = 3,14$. Подставив данные в формулу, получаем при диаметре чашки, равном 10 см, площадь чашки 78,5 кв. см. При отсутствии прибора для счета колоний бактерий можно использовать обычную миллиметровую бумагу, в которой вырезают "окошко" площадью 1 кв. см. Подсчет колоний производят с лупой, как указано выше.

Пример. Если среднее число колоний на 1 кв. см составляет 18, диаметр чашки 10 см, то число колоний на всей площади чашки $18 \times 78,5 = 1413$, округляя в ответе, указывают 1400.

Число колоний, выросших на чашке, должно отражать количество жизнеспособных микроорганизмов, содержащихся в засеянном объеме исследуемого материала. Поскольку последний, как правило, засевают в разведенном виде, число выросших на чашке колоний умножают на степень взятого разведения, рассчитывают среднее арифметическое и устанавливают количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 г (мл) продукта.

При установлении количества мезофильных бактерий не все чашки могут быть использованы для вычисления среднего арифметического:

а) нельзя использовать посеvy для вычисления среднего арифметического, если количество выросших колоний на чашках менее 30. В этом случае в протокол исследований вносят показатели обсемененности, полученные при подсчете колоний только по одной или двум чашкам, число колоний на которых больше 30. В случае роста колоний на засеянных чашках в количестве менее 30 в результатах анализа рекомендуется следующая формулировка: "Рост единичных колоний при посеве (указать количество засеянного продукта)";

б) не используются посеvy для вычисления среднего арифметического показателя на тех чашках, на поверхности которых более чем на 1/2 площади отмечается ползучий рост спорообразующих микроорганизмов, последние могут маскировать рост прочих бактерий. Возможны случаи, когда на чашках из всех разведений получен рост спорных микроорганизмов и подсчет изолированных колоний практически не возможен. В этих случаях в протоколе исследования следует указывать: "Рост спорообразующих микроорганизмов".

Пример расчета. Если на чашках Петри при посеве 0,1 г продукта выросло в среднем 135 колоний, а при посеве 2-го разведения (0,01 г продукта) - 9 колоний, то в результатах исследования учитывают цифровые данные, полученные при посеве 1-го разведения, т.е. количество микроорганизмов $135 \times 10 = 1350$ в 1 г продукта.

Для получения более точных данных по количеству мезофильных бактерий целесообразно сопоставлять результаты подсчета колоний, полученные на чашках с посевами материала из последовательных разведений. Числа подсчитанных колоний должны примерно соответствовать кратности взятых разведений. Если количество колоний на чашках с посевами из последующих разведений (1:10, 1:100) почти совпадает или мало между собой различается, то это указывает на недостаточное перемешивание посевного материала при приготовлении разведений и перед посевом.

4.4. Метод определения количества и титра бактерий группы кишечных палочек.

Для приведения в соответствие показателя "бактерии группы кишечных палочек" с принятой международной номенклатурой (Coliformes - ФАО/ВОЗ и СЭВ), а также с действующими ГОСТ 2874-82 ("Вода питьевая") в настоящих "Методических указаниях" к бактериям группы кишечных палочек отнесены граммотрицательные, не образующие спор палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 36 град. С +/- 1 град. С.

При необходимости производится дальнейшее исследование с идентификацией до *E. coli*.

В тех случаях, когда на продукт имеется норматив - отсутствие бактерий группы кишечных палочек в определенной массе продукта (альтернативный показатель), то результат записывается в соответствии с количеством продукта, подвергнутого микробиологическому анализу. Например, "бактерии группы кишечных палочек в 1 г - отсутствуют".

В тех случаях, когда продукт должен содержать сравнительно

3

низкие количества БГКП - не выше 10 (например, диетические молочные продукты - творог, сметана детская диетическая и т.д.), определение БГКП проводят методом наиболее вероятного числа (НВЧ).

В тех случаях, когда на продукт имеется действующий ГОСТ, предусматривающий норматив по коли-титру, или необходимо выявить значительную степень загрязнения продукта БГКП, определяют их коли-титр.

4.4.1. Методика посева продуктов при альтернативном определении БГКП.

Для посева используется то количество продукта, в котором в соответствующей НТД предусматривается отсутствие БГКП. При этом продукты жидкой консистенции (напитки, кисели, компоты) засевают непосредственно в среду Кесслер с лактозой (с поплавком) или в среду КОДА, соблюдая соотношение продукта и среды 1:10. Продукты плотной консистенции подготавливают к посеву в соответствии с п. 4.1. Посевы помещают в термостат при температуре 37 град. С на 24 часа. При отсутствии признаков роста - газообразования или изменения цвета среды - дают заключение о соответствии исследованного продукта нормативу (например, БГКП в 1 г отсутствуют). При наличии признаков роста на среде КОДА дают заключение о несоответствии продукта нормативу на БГКП. При наличии признаков роста на среде Кесслер с лактозой необходимо для окончательного заключения о присутствии в продукте БГКП произвести высев из газ-положительных пробирок на чашки со средой Эндо. Чашки помещают в термостат с температурой 37 град. С на 18 - 20 часов. Посевы просматривают. Из колоний, подозрительных или типичных для БГКП, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Обнаружение граммотрицательных палочек указывает на наличие БГКП.

4.4.2. Определение количества бактерий группы кишечных палочек методом наиболее вероятного числа - НВЧ (Coliformes - ФАО/ВОЗ и СЭВ).

Группа колиформных бактерий включает все аэробные и факультативно анаэробные граммотрицательные неспорообразующие палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа в течение 24 - 48 часов при 36 град. С +/- 1 град. С, относящиеся к *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Serratia*. В связи с тем, что в п. 4.1 настоящих "Методических указаний" принято определять БГКП по ферментации лактозы при 36 град. С +/- 1 град. С в течение 24 - 48 часов, то группы микроорганизмов, относящиеся к "колиформным бактериям" и БГКП, в настоящих "Методических указаниях" максимально сближены и по существу являются идентичными.

Поэтому метод определения НВЧ для колиформных бактерий отражает и определение наиболее вероятного числа БГКП в исследуемом объеме продукта.

4.4.2.1. Ход исследования.

Гомогенат, приготовленный по п. 4.1, или жидкий продукт, разведенный 1:10, набирают в пипетку в количестве 1,0 мл и переносят в пробирку, содержащую 9 мл 0,1% пептонной воды или изотонического раствора хлорида натрия, смешивают осторожно, набирая и выдувая из пипетки 10 раз, получая т.о. разведение продукта 1:100. Затем готовят разведения 1:1000, перенося каждый раз стерильной пипеткой 1 мл из приготовленного разведения в следующую пробирку с 9 мл 0,1% пептонной воды. Осторожно встряхивают все разведения.

Вносят по 1 мл разведения продукта 1:10 в 3 пробирки с 10 мл среды КОДА. Таким же образом производят посев двух последующих разведений 1:100 и 1:1000, используя для этих целей каждый раз

чистую стерильную пипетку.

Посевы инкубируют при 36 град. С +/- 1 град. С в течение 24 часов.

Регистрируют все пробирки, показавшие образование газа или изменение цвета среды через 24 часа. Пробирки без признаков роста инкубируют еще 24 часа и затем регистрируют те пробирки, где есть признаки роста. Затем проводят тест, подтверждающий наличие БГКП в исследуемом продукте, для чего переносят одну полную петлю из каждой положительной пробирки со средой КОДА в отдельные пробирки с желчно-лактозным бульоном, содержащим бриллиантовую зелень (п. 6.6) - средой ЖЛБ, и инкубируют эти пробирки при 37 град. С в течение 24 - 48 часов. По образованию газа в поплавках регистрируют число положительных пробирок, которые подтверждают наличие БГКП.

4.4.2.2. Расчет наиболее вероятного числа (НВЧ) БГКП.

Наиболее вероятное число БГКП рассчитывается в зависимости от количества пробирок с положительной пробой на газообразование в ЖЛБ по [таблице 4.4.2.3](#). Например, положительное газообразование отмечено в 3-х пробирках посева разведения 1:10, в 1 пробирке посева разведения 1:100 и 0 пробирок из разведения 1:1000. Из таблицы видно, что НВЧ для такой комбинации положительных реакций равно 43 бактериям в 1 г продукта. В заключении указывают: "1 г или 1 мл продукта содержит 43 БГКП".

Таблица 4.4.2.3

ТАБЛИЦА ПЕРЕСЧЕТА НВЧ И ПРЕДЕЛЫ С 95% ВЕРОЯТНОСТИ
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ 3-Х ПРОБИРОК

Число положительных пробирок с разведениями			НВЧ на 1 г или 1 мл	Пределы с 95% вероятности	
1:10	1:100	1:1000		минимальный	максимальный
0	0	0	менее 3		
0	0	1	3	менее 0,5	9
0	1	0	3	менее 0,5	13
1	0	0	4	менее 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	16	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	более 2400		

4.4.2.4. Определение E. coli по методу НВЧ.

При необходимости определения наличия E. coli в исследуемом на БГКП продукте по методу НВЧ одновременно с подтверждающим пересевом на ЖЛБ с бриллиантовой зеленью может быть сделан пересев из всех пробирок с наличием признаков роста на среде КОДА на среду Кесслер с лактозой или на среду для E. coli (п. 6.7) - ЕС-бульон. Засеянные пробирки инкубируют при 44 град. С +/- 1 град. С 24 часа и регистрируют образование газа.

Для дифференциации выделенных культур применяют реакции на индол, метил-рот, Фогес-Проскауэр и цитрат.

Из пробирок с положительной реакцией (образование газа) штрихом производят посев на чашку с агаром Левина таким образом, чтобы получить изолированные колонии, и инкубируют 18 - 24 часа при 37 град. С.

Переносят 2 - 3 колонии с каждого выросшего посева на среде Левина на чашку или пробирку с 2% МПА и инкубируют 18 - 24 часа при 37 град. С. В то же время из каждой культуры готовят мазки и производят окраску по Граму.

Постановка тестов ИМАЦ

Тест на индол

Культуру со скошенного агара инокулируют в пробирку с 5 мл индольной среды (п. 6.10) и инкубируют при 37 град. С в течение 24 часов. Добавляют 1 мл индольного реактива. При наличии индола в пограничном слое в течение 5 мин. появляется красное окрашивание - положительная реакция.

Реакция Фогес-Проскауэра (на ацетилметилкарбинол)

Культуру со скошенного агара петлей вносят в пробирку с 5 мл среды Кларка (п. 6.12). Посев инкубируют при 37 град. С в течение 48 часов. Затем к 1 мл культуры, перенесенному в другую пробирку, добавляют 0,6 мл этанолнафтольного реактива и 0,2 мл раствора КОН. Встряхивают после добавления каждого реактива, читают реакцию через 15 минут. Учет результатов возможен и через 2 часа. Окраска от розовой до ярко-красной показывает, что реакция на образование ацетилметилкарбинола положительная.

Тест на метил-рот

Инокулируют пробирку со средой Кларка и инкубируют в течение 48 часов при 36 град. С +/- 1 град. С (параллельно с постановкой реакции на ацетилметилкарбинол), в оставшиеся после постановки реакции Фогеса-Проскауэра 4 мл культуры добавляют 4 - 5 капель индикатора метил-рот в каждую пробирку. Реакция ферментации углеводов с образованием кислоты положительная, если появилось красное окрашивание.

Тест с утилизацией цитрата

Культуру с МПА пересевают в пробирку со средой Козера (цитратной) или на чашку со средой Симмонса, инкубируют 96 часов при 37 град. С и проверяют рост. Отсутствие роста и изменения цвета среды - реакция отрицательная. Наличие роста, изменение окраски среды с оливково-зеленого цвета на васильковый свидетельствует об утилизации цитрата - реакция положительная.

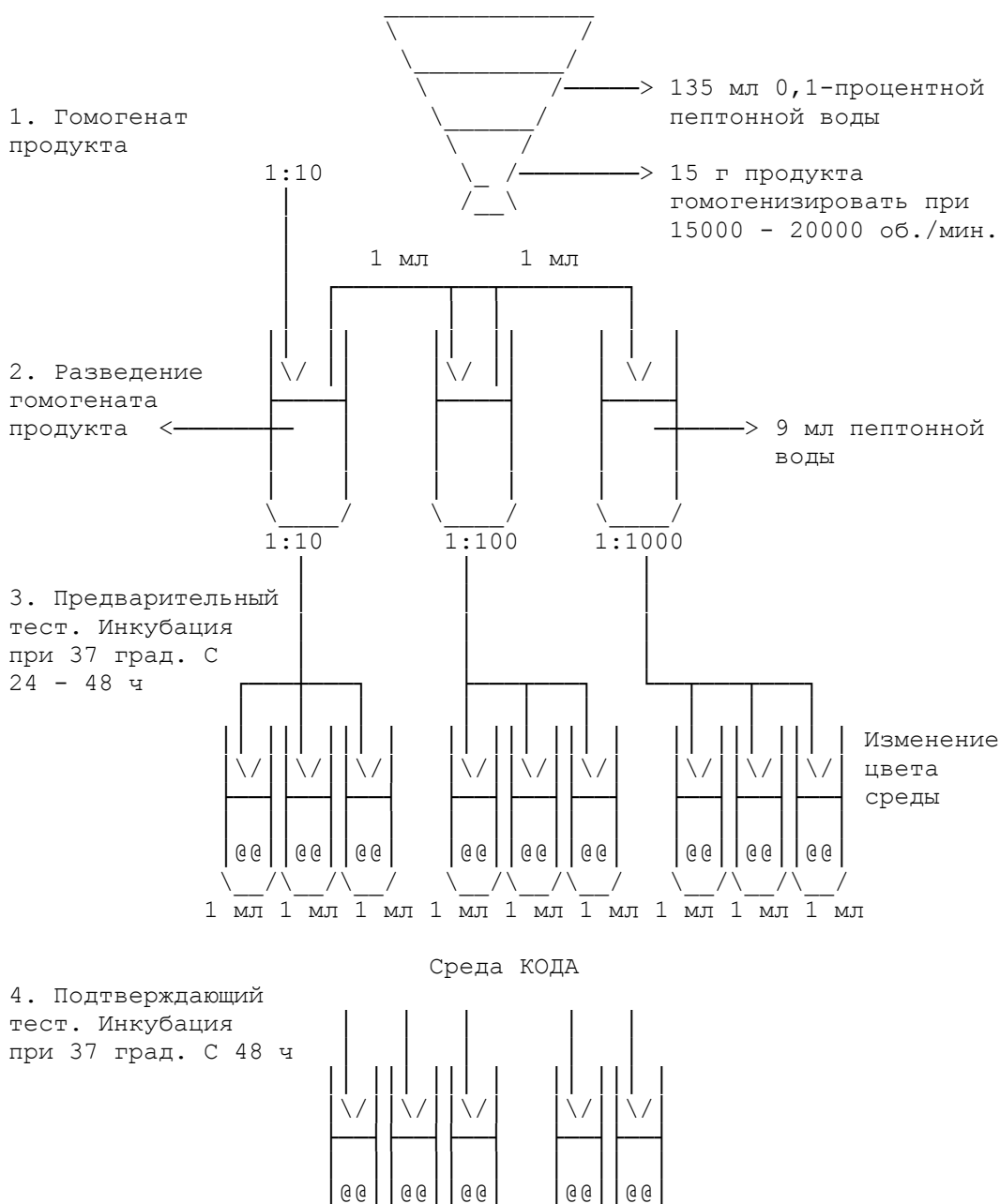
Таблица 4.4.2.5

КЛАССИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК ПО ТЕСТАМ ИМАЦ

Индол	Метил-рот	Фогес/Проскауэр	Цитрат	ТМП
+	+	-	-	Типичная E. coli
-	+	-	-	Атипичная E. coli
-	-	+	+	Типичный Ent. aerogenes

+	-	+	+	Атипичный Ent. aerogenes
+	+	-	+	Типичный Citrobacter
-	+	-	+	Атипичный Citrobacter

Используя табл. 4.4.2.5, принимают, что E. coli - это грамотрицательные, неспорообразующие палочки, образующие газ из лактозы и дающие положительную или отрицательную реакцию на индол, положительную - с метил-рот и отрицательные реакции Фогеса-Проскауэра и на цитрат - - (+ - -) или (- + - -). Количество E. coli в 1 г рассчитывают по таблице 4.4.2.3, учитывая число положительных пробирок со средой Кесслер с лактозой или ЕС-бульоном, инкубированных при 44 град. С +/- 1 град. С. В заключении указывают: "В 1 г (мл) продукта содержится "N" E. coli".





Бульон с лактозой, бычьей желчью и бриллиантовым зеленым или ЕС-бульон или среда Кесслер с лактозой

5. Регистрация пробирок с наличием газа и расчет НВЧ по таблице

Схема 1.

Определение количества бактерий группы кишечных палочек методом НВЧ

4.4.3. Метод определения коли-титра БГКП.

Под коли-титром следует понимать наименьшее количество исследуемой пробы, выраженное в мл (вода, жидкие пищевые продукты) или в г (плотные пищевые продукты), в котором обнаруживается присутствие бактерий группы кишечных палочек.

При определении титра кишечных палочек выявляют их наличие в различных объемах исследуемого продукта.

При наличии стандартных методов подвергают исследованию те количества продукта, которые предусмотрены соответствующими ГОСТ, весь ход исследования, сроки и температура выращивания, а также количественный и качественный учет кишечных палочек должны соответствовать ГОСТ на тот или иной пищевой продукт.

4.4.3.1. Методика посева пищевых продуктов, не имеющих ГОСТ <*>.

<*> В тех случаях, когда на исследуемый продукт имеется микробиологический показатель, то засеваются соответствующее количество продукта (п. 4.4.1).

Первый этап. Первичные посевы на среду накопления.

Засевают 4 или более десятикратно убывающих количеств пищевого продукта, например: 10,0; 1,0; 0,1; 0,01 мл (г).

В качестве среды накопления применяют среду Кесслер с лактозой или среду КОДА. Среды разливают в пробирки не менее чем по 5 мл для посева малых объемов (1 мл, г и менее). Для посева объема от 10 мл и более среду разливают во флаконы по 50 - 100 мл (применение поплавков не обязательно). Для определения титра бактерий группы кишечных палочек засевают в среду Кесслер исходную 10-процентную взвесь в количестве 100 мл (10 г продукта) во флакон со 100 мл среды двойной концентрации, 10 мл (1 г продукта) - во флакон с 50 мл среды, 1,0 (0,1 г продукта), а также 1,0 мл из разведения 1:100 (0,01 г продукта) и т.д. - в пробирки с 5,0 мл среды. Посевы выдерживают в термостате при 37 град. С 16 - 24 часа.

Второй этап. Посев на плотную среду Эндо.

Из всех пробирок с посевами на среде Кесслер или КОДА независимо от помутнения среды, производят посевы на сектора чашек со средой Эндо (при отсутствии среды Эндо пользуются средой Левина). Для получения изолированных колоний берут петлей минимальное количество материала при значительном помутнении среды Кесслер и производят посев частым штрихом. Чашки с посевами помещают в термостат при 37 град. С на 16 - 24 часа.

Чашки с посевами на среде Эндо просматривают. При отсутствии характерных колоний на всех секторах чашки дают ответ - "титр бактерий группы кишечных палочек более 11,1". При наличии на среде Эндо колоний, характерных для бактерий группы кишечных палочек - красных с металлическим блеском или без него, розовых с темным центром, розовых, слизистых, бледно-розовых, производят их изучение <*>.

<*> Лактозоотрицательные колонии (бесцветные) подвергают дальнейшему изучению для установления их возможной принадлежности к патогенным эндобактериям, для чего высевают на среду Ресселя или Олькеницкого. Последующее изучение производят в соответствии с Инструкцией о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях, Москва, 1975.

Из изолированных колоний, характерных для бактерий группы кишечных палочек, готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. В случае обнаружения в препарате смешанной культуры выбирают другую колонию и производят рассев на чашку со средой Эндо для получения чистой культуры. При отсутствии в мазках грамотрицательных палочек дают ответ - "титр бактерий группы кишечных палочек выше 11,1".

Заключение о наличии бактерий группы кишечных палочек только по внешнему виду колоний, без их изучения, недопустимо.

В случае обнаружения в препаратах грамотрицательных палочек исследование продолжают. Из проверенных колоний грамотрицательных палочек производят высевы на среду Гисса с глюкозой, разлитую в пробирки с поплавками. При наличии однотипных колоний грамотрицательных палочек на всех 4-х секторах чашки со средой Эндо допускается высев колоний на среду Гисса с глюкозой из двух последних секторов (разведений). Инкубация при 37 град. С 18 - 24 часа. Для ускорения анализа высевы из колоний производят в пробирки с небольшим количеством подогретой до 37 град. С среды (1,5 - 2,0 мл). Пробирки с посевами ставят в термостат при 37 град. С и просматривают через 5 - 6 часов роста. Наличие кислото- и газообразования в них указывает на присутствие бактерий группы кишечных палочек в том или ином засеянном объеме; пробирки с посевами, не забродившими через 4 - 6 часов, вновь помещают в термостат при 37 град. С и выдерживают до 16 - 24 ч.

4.4.3.2. Учет результатов.

Для установления коли-титра применяют стандартные таблицы. Пользование таблицами возможно только при определенном количестве засеянных объемов. Чаще всего для пищевых продуктов, на которые не имеется ГОСТ, используются таблицы, рассчитанные на посеvy 4 десятикратно убывающих количеств от 10,0 г до 0,01 г. Если предполагается более интенсивное обсеменение продукта бактериями группы кишечных палочек, то производят посеvy больших разведений от 0,001 до 0,00001 г и для вычисления титра бактерий группы кишечных палочек пользуются таблицами 4.4.3.4; 4.4.3.5; 4.4.3.6 в зависимости от того, в каком разведении еще обнаруживается рост кишечных палочек, заканчивая учет двумя последними разведениями, в которых имеется наличие (в предпоследней) и отсутствие (в последней пробирке) роста бактерий группы кишечных палочек. Например, 0,1+; 0,01+; 0,001+; 0,0001-. В данном случае следует пользоваться таблицей 4.4.3.5. Для данной комбинации результатов коли-титр равняется 0,0004.

ТАБЛИЦЫ ДЛЯ ВЫЧИСЛЕНИЯ КОЛИ-ТИТРА В ПРОДУКТАХ

Таблица 4.4.3.3

Объемы: 10,0; 1,0; 0,1 и 0,01 мл					
10,0	1,0	0,1	0,01	коли-индекс	коли-титр
-	-	-	-	менее 90	более 11,1
-	-	-	+	90	11,1
-	-	+	-	90	11,1
-	+	-	-	95	10,5
-	-	+	+	180	5,6
-	+	-	+	190	5,3
-	+	+	-	220	4,6
+	-	-	-	230	4,3
-	+	+	+	280	3,6
+	-	-	+	920	1,1
+	-	+	-	940	1,0
+	-	+	+	1800	0,6
+	+	-	-	2300	0,4
+	+	-	+	9600	0,1
+	+	+	-	23800	0,04
+	+	+	+	более 23800	менее 0,04

Таблица 4.4.3.4

Объемы: 1,0; 0,1; 0,01 и 0,001 мл					
1,0	0,1	0,01	0,001	коли-индекс	коли-титр
-	-	-	-	менее 900	более 1,11
-	-	-	+	900	1,11
-	-	+	-	900	1,11
-	+	-	-	950	1,05
-	-	+	+	1800	0,56
-	+	-	+	1900	0,53
-	+	+	-	2200	0,46
+	-	-	-	2300	0,43
-	+	+	+	2800	0,36
+	-	-	+	9200	0,11
+	-	+	-	9400	0,10
+	-	+	+	18000	0,06
+	+	-	-	23000	0,04
+	+	-	+	96000	0,01
+	+	+	-	238000	0,004
+	+	+	+	более 238000	менее 0,004

Таблица 4.4.3.5

Объемы: 0,1; 0,01; 0,001 и 0,0001 мл					
0,1	0,01	0,001	0,0001	коли-индекс	коли-титр
-	-	-	-	менее 9000	более 0,111
-	-	-	+	9000	0,111
-	-	+	-	9000	0,111
-	+	-	-	9500	0,105
-	-	+	+	18000	0,056
-	+	-	+	19000	0,053
-	+	+	-	22000	0,046
+	-	-	-	23000	0,043
-	+	+	+	28000	0,036
+	-	-	+	92000	0,011
+	-	+	-	94000	0,010
+	-	+	+	180000	0,006
+	+	-	-	230000	0,004
+	+	-	+	960000	0,001
+	+	+	-	2380000	0,0004
+	+	+	+	более 2380000	менее 0,0004

Таблица 4.4.3.6

Объемы: 0,01; 0,001; 0,0001 и 0,00001 мл					
--	--	--	--	--	--

0,01	0,001	0,0001	0,00001	коли-индекс	коли-титр
-	-	-	-	менее 90000	более 0,0111
-	-	-	+	90000	0,0111
-	-	+	-	90000	0,0111
-	+	-	-	95000	0,0105
-	-	+	+	180000	0,0056
-	+	-	+	190000	0,0053
-	+	+	-	220000	0,0046
+	-	-	-	230000	0,0043
-	+	+	+	280000	0,0036
+	-	-	+	920000	0,0011
+	-	+	-	940000	0,0010
+	-	+	+	1800000	0,0006
+	+	-	-	2300000	0,0004
+	+	-	+	9600000	0,0001
+	+	+	-	23800000	0,00004
+	+	+	+	более 23800000	менее 0,00004

4.5. Метод определения микроорганизмов рода *Staphylococcus*.

Клетки стафилококков сферические, 0,5 - 1,5 мкм в диаметре. В результате деления более чем в одной плоскости образуют гроздьевидные скопления. Неподвижные, грамположительные. Образуют внеклеточные ферменты и токсины. Температурный оптимум 35 - 40 град. С, пределы для роста 6,5 - 46 град. С. Оптимум pH 7,0 - 7,5, пределы pH для роста - 4,2 - 9,3. Стафилококки активно образуют пигмент (липохром) золотистый, эмалево-белый, лимонно-желтый, особенно при комнатной температуре (20 град. С) и при доступе воздуха. Колонии стафилококков на плотных средах имеют форму правильных дисков от 2 до 4 мм в диаметре. Края колонии ровные, поверхность слегка выпуклая, блестящая, непрозрачная, окрашена в цвет пигмента. В жидких средах дают сильное диффузное помутнение, образуя постепенно осадок. Согласно последней классификации (Берги, 1980) род *Staphylococcus* включает три вида: *Staph. aureus*, *St. epidermidis*, *St. saprophyticus*. Стафилококки, относящиеся ко всем трем видам, могут быть причиной различных заболеваний человека, а стафилококки, вырабатывающие энтеротоксины, при определенных условиях могут вызывать пищевые интоксикации. В настоящее время *Sasph. aureus* целесообразно использовать в качестве санитарно-показательного микроорганизма при исследовании пищевых продуктов, а также при обследовании объектов общественного питания, особенно пищеблоков в детских дошкольных и подростковых учреждениях, для оценки их санитарного содержания.

4.5.1. Методика количественного определения *Staph. aureus*.

Методика выделения *St. aureus* предусматривает его количественное определение в пищевых продуктах и наличие его в смывах.

1 этап. Из исходной 10% взвеси продукта производят посев на элективные среды: желточно-солевой (ЖСА) или молочно-солевой (МСА) агары. Основную 10% взвесь в количествах 0,5 и 0,1 мл (0,05 и 0,01 г продукта) наносят на поверхность среды, равномерно распределяют и тщательно растирают шпателем. Кроме этого, 1 мл исходной взвеси (0,1 г продукта) засевают в пробирки с 5 мл 6,5-процентного солевого бульона. Продукты жидкой консистенции высевают на плотные среды в количестве 0,5 и 0,1 мл, а в жидкие - 1,0 мл. Продукты с пониженной водной активностью (a_w 0,86) или с повышенным содержанием поваренной соли дополнительно засевают также в количестве 1,0 мл (0,1 г, мл продукта) на сахарный бульон, разлитый в пробирки по 5 мл.

Посевы инкубируют при 37 град. С в течение 18 - 24 часов, чашки с плотными средами оставляют еще на сутки при комнатной температуре <*>.

<*> На средах, содержащих желток, стафилококк, выделенный от человека, образует у 60 - 70% выделенных культур венчик вокруг колонии (положительная лецитовителлазная реакция). Стафилококки животного происхождения дают положительную лецитовителлазную реакцию в 5 - 10% культур.

2 этап: а) Просматривают посевы на МСА или ЖСА, на ЖСА колонии стафилококков дают радужный венчик, на МСА - образуют пигмент: золотистый, кремовый, эмалево-белый и др. Изолированные колонии, подозрительные на стафилококк, изучают, микроскопируют с окраской по Граму и высевают на скошенный МПА или на сектора чашки с молочным агаром. Число колоний, взятых для идентификации, должно быть не менее 5 - 7.

б) Из сред обогащения производят высевы на сектора чашки с молочным агаром.

Все посеы инкубируют при 37 град. С в течение 18 - 24 часов.

3 этап. Выделенную чистую культуру с секторов на чашках с молочным или из пробирок со скошенным МПА подвергают микроскопии с окраской по Граму. При наличии мелких грамположительных кокков ставят реакцию плазмокоагуляции.

4.5.2. Постановка реакции плазмокоагуляции.

Наилучшим методом предварительной идентификации *St. aureus* в лабораторных условиях является коагулазная проба в пробирке, закрытой ватной пробкой, с кроличьей или человеческой плазмой. При чтении реакции плазмокоагуляции установлено 3 градации активности фермента коагулазы:

1) ++++ - сгусток плотный, 2) +++ - сгусток, имеющий небольшой отсек, 3) ++ - сгусток в виде взвешенного мешочка.

Эту реакцию следует читать очень осторожно, чтобы не повредить и не нарушить начало ее образования.

Постановка реакции. В пробирку с 0,5 мл цитратной плазмы, разведенной изотоническим раствором натрия хлорида в соотношении 1:4, вносят петлю суточной культуры стафилококка и ставят в термостат при 37 град. С. Осторожно просматривают реакцию плазмокоагуляции через 30 минут, 1 час, 2 - 4 часа и оставляют до утра при комнатной температуре для окончательного учета. Ускорение реакции производят за счет использования 3 - 4 часовых бульонных культур, добавляя их в количестве 0,1 мл к 0,5 мл разведенной плазмы.

После полного подтверждения принадлежности выделенных штаммов к *St. aureus* производят подсчет колоний на плотной среде и устанавливают содержание стафилококков в 1 г (мл) исследуемого продукта.

4.5.3. Определение *St. aureus* в особо скоропортящихся продуктах, имеющих микробиологический норматив <*>.

<*> "Временные указания по микробиологическим нормативам для ряда особо скоропортящихся пищевых продуктов и методам их исследования", М., 1982 г. Утв. МЗ СССР 30 декабря 1981 г. N 2510-81.

В ряде продуктов общественного питания микробиологические нормативы предусматривают отсутствие *St. aureus* в 0,1 г и в 1,0 г продукта.

В тех случаях, когда отсутствие *St. aureus* предусматривается в 0,1 г продукта, необходимо 1 мл 10-процентной взвеси продукта, приготовленной в соответствии с п. 4.2, внести в 9 мл солевого бульона (6,5% аСl). В тех случаях, когда отсутствие *St. aureus* предусматривается в 1 г продукта, для этих целей усредненная проба массой в 10 г растирается в стерильной ступке и отсюда делается навеска на стерильном часовом стекле или стерильном пергаменте массой 1,0 г и засеивается в 9 мл солевого бульона.

Посевы инкубируют при 37 град. С в течение 18 - 24 часов. После чего из солевых бульонов производят подтверждающий посев петлей на сектора чашки Петри с желточно-солевым агаром или молочно-солевым агаром. Инкубацию посевов производят при 37 град. С в течение 18 - 24 часов. После чего чашки просматривают. При отсутствии роста типичных колоний для *St. aureus* делают заключение об отсутствии этого микроорганизма в исследуемой навеске продукта (в 1,0 г или 0,1 г).

При наличии роста подозрительных на стафилококки колоний производят их изучение, как в п. 4.5.1 (этапы 2 и 3), п. 4.5.2.

При наличии коагулазоположительных *St. aureus* делают заключение о присутствии этого микроорганизма в исследуемой навеске продукта. Следовательно, данный продукт не соответствует требуемому нормативу - "отсутствие *St. aureus* в 1,0 или в 0,1 г продукта".

4.5.4. Дополнительные тесты идентификации.

При наличии санитарно-эпидемического неблагополучия следует использовать дополнительные

тесты. Прежде всего еще раз уточнить реакцию плазмокоагуляции, с этой целью культуру пересевают 2 - 3 раза на скошенном МПА и повторяют постановку реакции или засевают культуру на чашках с мясо-пептонным агаром для проведения повторной идентификации из новых колоний стафилококков. В случае неудовлетворительных результатов целесообразно из первичных посевов взять ряд других колоний и подвергнуть их вновь идентификации.

Если выделенную культуру не идентифицировали как *St. aureus*, следует использовать дополнительные тесты: постановку реакции на термостабильную ДНКазу, окисление маннита, фосфатазу, лецитовителлазу.

4.5.4.1. Тест на лецитовителлазу.

При использовании для первичного посева среды, содержащей желток, специального дополнительного определения лецитовителлазной активности у стафилококков проводить не следует. В случае выделения культур с других сред и необходимости определения у них этого признака на чашку с желточным агаром сеют испытуемую культуру штрихом или бляшкой - последнее экономнее. Чашки инкубируют при 37 град. С в течение 18 - 20 часов. При положительном результате вокруг колонии стафилококка образуется радужный венчик, что обусловлено выделением фермента лецитовителлазы и разложением лецитина, находящегося в среде. Реакцию следует учитывать в отраженном свете.

4.5.4.2. Реакция на разложение маннита в анаэробных условиях.

Используют среду, приготовленную из сухого препарата с индикатором ВР и маннитом, разливают в пробирки по 10 мл, стерилизуют при 0,7 атм. 20 минут. Перед посевом среду освобождают от воздуха, для чего пробирки кипятят в водяной бане при 100 град. С 10 минут, затем быстро охлаждают в ледяной воде и немедленно производят посев уколком. Сверху засеянную среду заливают расплавленным 2% водным агаром слоем 2 - 3 см, чтобы исключить попадание воздуха. Посевы термостатируют при 37 град. С в течение 4 дней. Просмотр осуществляют на 2 и 4 дни. Результаты расценивают как ферментацию маннита, когда нижняя и верхняя части среды четко изменяют цвет из зеленого на синий. В этом случае микроорганизмы идентифицируют как *St. aureus*. Если посинеет только верхняя часть среды, то имеет место окисление маннита. Если спустя 4 дня инкубации не произошло посинения, сбраживания маннита не произошло. В 2-х последних случаях микроорганизмы относят к *St. epidermidis* или *St. saprophyticus*.

4.5.4.3. Определение активности кислой фосфатазы.

Среда: к 100 мл 2% МПА, расплавленного и остуженного до 45 град. С, добавляют 50 мг паранитрофенилфосфата натрия, разливают в чашки Петри. Посев производят бляшками - до 20 бляшек на чашку. Реакцию можно учитывать уже через 2 часа инкубации при 37 град. С. Вокруг бляшек при положительной фосфатазной пробе среда окрашивается в желтый цвет. Интенсивность окрашивания увеличивается через 18 - 24 часа - практически окрашивается вся среда.

4.5.4.4. Тест на наличие термостабильной дезоксирибонуклеазы (ДНКазы).

ДНКазу определяют по методу, основанному на метахроматических свойствах толуидина голубого. Этот метод диффузии в агар термостабильной ДНКазы *St. aureus* позволяет определить ее в концентрации примерно 0,005 мг/мл.

Среда: к 1000 мл 0,05 М трис-буфера (оксиметиламинометан), pH 9,0, добавляют 0,3 г ДНК, затем 10,0 г агара Дифко, 1 мл 0,01 М CaCl₂, 10,0 г NaCl, 3,0 мл 0,1 М толуидина голубого. Среду разливают в пробирки по 12 - 15 мл, закрывают резиновыми пробками и хранят в холодильнике до 3 - 5 месяцев. Перед постановкой реакции среду растапливают и разливают в чашки Петри, подсушивают при 4 град. С в течение 1 часа, вырезают лунки диаметром 3 мм, отсасывают пипеткой агар и вносят в лунки пастеровской пипеткой культуры, инкубируют при 37 град. С.

Перед изучением культур пробирки с суточным ростом стафилококков на полужидком агаре прогревают в кипящей водяной бане 15 минут и вносят в лунки в агаровой пластинке, содержащей толуидин голубой. Зоны просветления с розовым окрашиванием образуются в результате гидролиза ДНК, находящейся в среде, термостабильной ДНКазой стафилококков. Появление через 1 - 2 часа после внесения розовоокрашенных зон расценивается как положительная реакция на наличие термостабильной ДНКазы.

КонсультантПлюс: примечание.

Нумерация подпунктов дана в соответствии с официальным текстом документа.

4.5.8. Идентификация стафилококков <*>.

<*> Тесты на окисление маннита, термоустойчивую ДНКазу, кислую фосфатазу проводят в случае отрицательной реакции плазмокоагуляции.

Дифференцирующие признаки (тесты)	Наименование вида		
	<i>St. aureus</i>	<i>St. epidermides</i>	<i>St. saprophyticus</i>
1. Морфология с окраской по Граму	мелкие кокки, грам +	кокки, грам +	крупные кокки, грам +
2. Реакция плазмокоагуляции	+	-	-
3. Ферментация маннита в анаэробных условиях	+	-	-
4. Лецитовителлазная активность	+	+ -	-
5. Тест на ДНКазу	+	-	-
6. Тест на кислую фосфатазу	+	-	-

4.6. Метод определения бактерий рода *Proteus*.

Среди этимологических факторов пищевых токсикоинфекций существенную роль могут играть бактерии рода *Proteus*. Обнаружение небольших количеств протей в исследуемых продуктах не является поводом для подозрения его как возбудителя пищевого отравления. Однако факт обнаружения протей является сигналом для проведения ряда санитарно-гигиенических и профилактических мероприятий на обследуемых объектах.

К роду *Proteus* относятся грамотрицательные бескапсульные, в основном, подвижные бактерии, разжижающие желатину и расщепляющие мочевину, не образующие ацетилметилкарбинол и дающие положительную реакцию с метил-рот.

На основании различий по некоторым ферментативным свойствам возможна дифференциация рода *Proteus* на две биогруппы: *Proteus vulgaris*, который образует индол, ферментирует мальтозу и не декарбоксилирует орнитин, и *Proteus mirabilis*, который не образует индола, не ферментирует мальтозу и декарбоксилирует орнитин.

4.6.1. Методика выделения бактерий рода *Proteus*.

1 день.

а) Для получения чистой культуры первичный посев исследуемого материала из основного разведения (10% взвесь) производят по 0,5 мл в конденсат свежескошенного агара по методу Шукевича.

На 2-й день просматривают посева на скошенном МПА, если наблюдается вползающий нежный рост вуалеобразный рост, то с верхнего края выросшей культуры готовят препарат, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных полиформных палочек дают заключение о наличии бактерий рода *Proteus* в исследуемом продукте.

Кроме того, можно использовать посев на поверхность питательной среды Плоскирева или среды

Вильсон-Блера, который производят в количествах 0,5 мл исходной взвеси, тщательно втирая шпателем, инкубируют при 37 град. С 18 - 24 часа. На поверхности сред Плоскирева или Вильсон-Блера вырастает О-форма протей. Для получения из О-форм колоний Н-форм одну петлю суточной бульонной культуры протей наносят на поверхность свежеприготовленного 1,5% МПА в центре чашки. Через 16 - 18 часов инкубирования при 37 град. С наблюдается феномен "роения" - поверхность покрывается тонким слоем налета с голубоватым оттенком.

После инкубации в течение 18 - 24 часов при 37 град. С чашки с посевами просматривают и отмечают колонии, подлежащие дальнейшему исследованию. На среде Плоскирева штаммы растут в виде прозрачных колоний, слегка подщелачивая среду, которая окрашивается вокруг них в желтоватый цвет. При более длительном хранении чашек с посевами колонии мутнеют, а центр их приобретает бурую окраску. На висмут-сульфитном агаре (среда Вильсон-Блера) через 48 часов штаммы вырастают в виде изолированных колоний грязно-коричневого цвета, окраска среды под колониями не изменяется.

Если рост 18 - 24 часовой культуры однородный, то для дальнейшего изучения используют не менее 3-х колоний. При росте разных колоний для их изучения надо брать больше колоний, различных по внешнему виду.

При наличии характерной микроскопической картины дают заключение о присутствии бактерий рода *Proteus* в исследуемом продукте <*>.

<*> Идентификацию бактерий рода *Proteus* проводят в случае эпидситуации на объекте в соответствии с Инструкцией о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санэпидслужбы при пищевых отравлениях, Москва, 1975.

Случайные находки бактерий рода *Proteus* при определении бактерий группы кишечных палочек необходимо отражать в ответе.

4.7. Определение сальмонелл.

В соответствии с рекомендациями ФАО/ВОЗ в большинстве пищевых продуктов нормируется отсутствие сальмонелл в определенной массе продукта. Сальмонеллы признаны индикаторными микроорганизмами при контроле пищевых продуктов на возможное присутствие патогенных микроорганизмов. В особо скоропортящейся продукции общественного питания сальмонеллы не допускаются в 25 г. Анализ проводят в соответствии с Инструкцией о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях, Москва, 1975.

5. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ СМЫВОВ

5.1. Объем исследования.

При текущем санитарном надзоре за предприятиями общественного питания и торговли, детскими и лечебными учреждениями исследование смывов проводят на присутствие бактерий группы кишечных палочек.

Исследование на наличие *St. aureus*, бактерий рода *Proteus*, определение общей бактериальной обсемененности производится по показаниям. Например:

а) исследование смывов на стафилококки проводят при обследовании кремово-кондитерских цехов, столовых и ресторанов, молочных кухонь и других пищеблоков, обращая особое внимание на контроль рук персонала;

б) общую микробную обсемененность можно определять для установления эффективности санитарной обработки посуды в посудомоечных машинах, а также при оценке новых моющих и дезинфицирующих средств.

В случае повторного обнаружения бактерий группы кишечных палочек в значительном проценте смывов на объекте рекомендуется провести исследование смывов с инвентаря, оборудования и рук персонала на наличие энтеробактерий <*>.

<*> При исследовании смывов по эпидпоказаниям производят посев тампона и смывной жидкости на среды обогащения - селенитный бульон или магниевую среду (возможно использование сред Мюллера и Кауфмана). Дальнейшее выделение и идентификацию проводят согласно Инструкции о порядке

расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санэпидслужбы при пищевых отравлениях, М., 1975.

5.2.1. Методика посева смывов на бактерии группы кишечных палочек.

При плановых санитарно-гигиенических обследованиях для выявления БГКП производят посевы смывов на среды Кесслер с лактозой или КОДА, при этом в пробирку со средой опускают тампон и переносят оставшуюся смывную жидкость.

Посевы на средах Кесслер или КОДА инкубируют при 37 град. С, через 18 - 24 часа со среды Кесслер производят высеив на плотную дифференциальную среду Эндо, со среды КОДА высеив производят только в случае изменения окраски среды или ее помутнения. Дальнейший ход исследования см. в п. 4.4.1.

5.2.2 Методика посева на общую бактериальную обсемененность.

Для определения общей обсемененности поверхностей контролируемых предметов взятие смывов производят по методике, описанной выше (п. 4.3), перед посевом в пробирку с тампоном добавляют 5 мл 0,1% пептонной воды или изотонического раствора хлорида натрия. Тампон тщательно отмывают, после чего 1,0 мл смывной жидкости помещают в чашку Петри и заливают расплавленным МПА. Чашки помещают в термостат при 30 град. С. Предварительный подсчет выросших колоний производят через 48 часов, окончательный - через 72 часа. Количество колоний, выросших на чашке, умножают на 10 для определения общего количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета.

5.2.3. Методика посева на St. aureus.

Для выявления St. aureus посев смывов производят на чашки с МСА или ЖСА, непосредственно втирая посевной материал тампоном, затем последний погружают в пробирку с 6,5% соевым бульоном. Если необходимо определить и бактерии группы кишечных палочек, то остатки смывной жидкости переносят пипеткой в среды Кесслер или КОДА (п. 4.4.1).

5.2.4. Оценка результатов.

Обнаружение санитарно-показательных и условно-патогенных бактерий в смывах с поверхностей чистых, подготовленных к работе предметов, инвентаря и оборудования, а также рук персонала свидетельствует о нарушении санитарного режима и дает основание для проведения административных мер.

6. РЕЦЕПТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

6.1. Изотонический раствор - 0,85% раствор хлористого натрия.

Для приготовления изотонического раствора с рН 6,9 - 7,0 используют дистиллированную воду, рН которой проверяют индикатором бромтимолблау, при его добавлении цвет воды должен быть бутылочно-зеленым. В иных случаях воду не используют. Изотонический раствор разливают в пробирки или флаконы в необходимых количествах, стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

6.2. 0,1-процентный водный раствор пептона (пептонная вода).

К 1 л дистиллированной воды добавляют 1 г пептона. После размешивания среду кипятят, фильтруют и разливают по пробиркам и флаконам в необходимых количествах, стерилизуют при 1 атм. 30 мин.

6.3. Среда для определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов.

Сухой питательный агар (ДагНИИПС)	- 35,0 г
Сухой экстракт кормовых дрожжей	- 2,5 г
Глюкоза	- 1,0 г
Вода дистиллированная	- 1000 мл

Довести рН до 7,0, разлить в пробирки по 15 мл, стерилизовать в течение 20 мин. при 121 град. С (1,1 атм.).

6.4. Среда Кесслер с лактозой.

К 1 л водопроводной воды прибавляют 10 г пептона и 50 мл желчи крупного рогатого скота, кипятят

смесь при помешивании 20 - 30 мин в водяной бане и фильтруют через вату. В полученном фильтрате растворяют 2,5 г лактозы и доводят объем до 1 л, устанавливают реакцию среды (рН 7,4 - 7,6), после чего добавляют 2 мл 1% водного раствора кристаллического фиолетового, разливают в пробирки по 5,0 мл, 10,0 мл и во флаконы по 50 мл. Готовая среда должна иметь темно-фиолетовый цвет. Среду стерилизуют при 1 атм. 10 мин., предварительно опустив в пробирки поплавки.

6.5. Среда КОДА.

Среду готовят по прописи на этикетке. Разливают по 5 и 10 мл в пробирки без поплавков.

6.6. Бульон с лактозой, бычьей желчью и бриллиантовым зеленым - ЖЛБ.

Пептон	- 10 г
Лактоза	- 10 г
Сухая бычья желчь	- 20 г (или 200 мл свежей фильтрованной желчи кр. рог. скота)
Бриллиантовый зеленый	- 0,0133 г
Дистиллированная вода	- 1000 мл

Растворяют пептон и лактозу в 500 мл дистиллированной воды, добавляют бычью желчь, растворенную в 200 мл воды, смешивают, доводят объем до 950 мл, рН до 7,4. Добавляют 13,3 мл 0,1% водного раствора бриллиантового зеленого, доводят общий объем водой до 1 л. Разливают в пробирки с поплавками по 10 мл. Стерилизуют 15 мин. при 121 град. С.

6.7. ЕС-бульон (для подтверждающего посева на E. coli по методу НВЧ) <*>.

<*> Пропись ФАО/ВОЗ в модификации Института питания АМН СССР.

Сухой панкреатический гидролизат казеина	- 20 г (или десятикратное количество жидкого ПГК с содержанием ок. 500 мг% аминного азота)
Желчь крупного рогатого скота жидкая	- 15 - 16 мл
Лактоза	- 5 г
K ₂ HPO ₄	- 4 г
KH ₂ PO ₄	- 1,5 г
NaCl	- 5 г
Дистиллированная вода	- 1000 мл

Растворяют ингредиенты, доводят рН до 6,9, разливают по 15 мл в пробирки с поплавками, стерилизуют в течение 15 мин. при 121 град. С.

6.8. Среда Гисса с глюкозой.

На 1 л дистиллированной воды берется 10 г пептона, 5 г хлористого натрия, 2,5 г глюкозы. В дистиллированную воду в начале добавляют пептон, хлористый натрий и кипятят до растворения ингредиентов, затем добавляют 10 мл реактива Андреде. Устанавливают рН 7,2 - 7,4, добавляют углевод и фильтруют. Среду разливают в стерильные пробирки с поплавками по 2 - 3 мл. Стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин.

Приготовление индикатора Андреде.

Фуксин кислый в количестве 1 г растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 32 мл нормального раствора едкого натра. Полученную смесь настаивают в течение 3-х суток при комнатной температуре или в течение суток при 37 град. С, после чего фильтруют. Реактив хранят во флаконе с притертой пробкой.

6.9. Среды Эндо, Левина.

Среды Эндо, Левина (эозинметиленовоголубой агар) выпускаются в сухом виде Дагестанским НИИ питательных сред, их следует готовить согласно прописям на этикетках банок. Изготовленные и разлитые в стерильные чашки Петри среды можно хранить при температуре 4 град. С +/- 1 град. С до 10 суток.

6.10. Среда для определения индолообразования.

Сухой панкреатический гидролизат казеина	- 10 г
NaCl	- 5 г
Д-каппа-трипрофан	- 1 г
Дистиллированная вода	- 1000 мл

Довести pH до 7,0, разлить в пробирки по 5 мл, стерилизовать 15 мин. при 121 град. С.

Реактив на индол:

Пара-диметиламинобензальдегид	- 5 г
Соляная кислота конц.	- 25 мл
Изоамиловый спирт	- 75 мл

6.11. Бульон на переваре Хоттингера для определения индолообразования.

В случае отсутствия среды 6.10 используется для теста на индол.

Для приготовления бульона основной перевар Хоттингера разводят дистиллированной водой (или водопроводной) до содержания аминного азота 120 - 130 мг%, добавляют хлористый натрий в концентрации 0,5%, K₂HPO₄ - 0,1%. Устанавливают pH 7,4 - 7,6 и кипятят 15 - 20 мин. Приготовленный бульон фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки по 5 - 8 мл. Стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

Индикаторная бумажка на индол:

Спирт этиловый 96 град.	- 50 мл
Парадиметиламинобензальдегид	- 2,5 - 3,0 г
Фосфорная кислота (конц.)	- 10 мл

Добавленные в спирт ингредиенты смешать до полного растворения. Полученной желтоватой жидкостью смочить край, приблизительно на 1/3, полоски фильтровальной бумаги. Цвет смоченного конца полоски бумаги должен быть желтым. При образовании индола изучаемой культурой цвет бумажки меняется от сиренево-розового до интенсивно-малинового.

6.12. Среда Кларка.

Пептон	- 5 - 7 г
Глюкоза	- 5 г
K ₂ HPO ₄	- 5 г
Дистиллированная вода	- 1000 мл

Растворить ингредиенты, довести pH до 6,9 и профильтровать. Стерилизовать 20 мин. при 115 град. С.

6.13. Раствор метилового красного для теста с метил-рот.

Растворить 0,1 г метилового красного в 300 мл 90% этилового спирта. Развести до 500 мл стерильной водой, хранить при T +4 град. С.

6.14. Реактивы для реакции Фогеса-Проскауэра.

5% альфа-нафтол: растворить 5 г альфа-нафтола в 100 мл абсолютного этилового спирта. Хранить при T +4 град. С.

40% KOH: растворить 40,0 г KOH (гранулы) приблизительно в 60 мл дистиллированной воды. Разбавить до 100 мл дистиллированной водой. Хранить при T +4 град. С.

6.15. Цитратная среда Козера.

Na (NH ₄) HPO ₄	- 1,5 г
K ₂ HPO ₄	- 1 г
MgSO ₄	- 0,2 г
Натрия цитрат трехзамещенный	- 3 г
Дистиллированная вода	- 1000 мл

Растворить ингредиенты в 950 мл дистиллированной воды, добавить 10 мл 0,5% спиртового раствора бромтимолового синего. Установить pH 6,8, проверяя значение pH на потенциометре. Довести объем дистиллированной водой до 1 л. Разлить в пробирки по 10 мл, стерилизовать в течение 15 мин. при 121 град. С.

6.16. Среда Симмонса.

Среда готовится аналогично среде Козера (6.15), но после измерения pH в нее добавляют 20 г +/- 0,1 г агар-агара на 1 л. Прогревают на водяной бане до растапливания агара, стерилизуют в течение 15 мин. при 121 град. С. Разливают в стерильные чашки Петри или пробирки.

6.17. Среда Ресселя с мочевиной из сухих питательных сред.

К 100 мл горячей стерильной дистиллированной воды добавляют 4 г сухого препарата с индикатором ВР и лактозой, 0,1 г глюкозы и 1 г мочевины. Полученную среду разливают в стерильные пробирки по 5 - 6 мл и стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин. или текучим паром 2 дня подряд по 15 - 20 мин.

6.18. Трехсахарный агар с мочевиной по Олькеницкому.

К 100 мл стерильного питательного агара добавляют 1 г лактозы, 0,02 г соли Мора, 0,3 г гипосульфита, 1 г сахарозы, 0,1 г глюкозы, 1 г мочевины, 0,4% раствора фенолового красного 0,4 мл. Предварительно растворяют соль Мора с гипосульфитом в одной пробирке с небольшим количеством воды, а в другой - мочевины с углеводами. После растворения все смешивают с агаром и фильтруют через стерильную марлю. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 20 мин. Горячую среду скашивают в пробирках. Незасеянная среда имеет бледно-розовый цвет.

6.19. Солевой бульон.

К 100 мл МПБ с pH 7,0 добавляют 6,5 г хлористого натрия. Разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

6.20. Сахарный бульон.

К 100 мл стерильного бульона Хоттингера с pH 7,2 - 7,4 и содержанием 130 - 150 мг% аминного азота добавляют глюкозу в количестве 1,0 г. После растворения среду разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют при 0,5 атм. в течение 20 мин.

6.21. Стерильное молоко.

Стерильное молоко готовят из обезжиренного молока (кислотность 16 - 18 град. Т), которое разливают в пробирки по 10 мл. Стерилизуют при 0,75 атм. 15 мин. Обезжиренное молоко получают путем центрифугирования или кипячения с последующим отстаиванием в цилиндре в холодильнике в течение 2-х дней.

6.22. Молочно-солевой агар.

К 100 мл расплавленного и остуженного до 45 град. С 2% питательного агара с концентрацией 6,5% хлористого натрия добавляют в количестве 10 мл стерильное обезжиренное молоко. Среду тщательно перемешивают и разливают по чашкам.

6.23. Желточно-солевой агар.

Желточно-солевой агар может быть приготовлен на основе сухого питательного агара, мясо-пептонного бульона или бульона Хоттингера.

При использовании МПБ к последнему добавляют 2% агар-агара и 6,5% хлористого натрия. При использовании бульона Хоттингера содержание аминного азота в нем должно составлять 150 мг%, для получения солевого агара добавляют 2% агар-агара и 6,5% хлористого натрия.

В случае использования сухого питательного агара к последнему добавляют 6,5% хлористого натрия. Солевой агар разливают во флаконы по 200 мл и стерилизуют при 1 атм. 30 мин.

Приготовление рабочего раствора желтка.

На дно стерильной чашки помещают яйцо, которое тщательно протирают ватой, смоченной спиртом. Пинцетом пробивают с двух противоположных сторон яйца 2 отверстия. Через одно из этих отверстий из яйца полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную банку с 5 - 6 бусинами. К желтку постепенно добавляют частями по 20 - 30 мл 180 - 200 мл стерильного изотонического раствора NaCl. Затем содержимое тщательно встряхивают.

Приготовление чашек.

На 100 мл расплавленного и остуженного до 45 град. С солевого агара добавляют 20 мл рабочего

раствора желтка. После полного размешивания агар в условиях бокса разливают в чашки по 15 - 17 мл. Чашки можно хранить в холодильнике до 1,5 - 2 недель.

6.24. Молочный агар.

К 100 мл 2-процентного расплавленного и остуженного до 45 град. С питательного агара добавляют 10 мл стерильного снятого молока. После тщательного перемешивания агар выливают в чашки по 12 - 15 мл.

6.25. Цитратная плазма кролика.

Цитратная плазма кролика для реакции плазмокоагуляции выпускается в сухом виде. Готовят непосредственно перед употреблением согласно прописи, прилагаемой в наставлении.

6.26. Среда для определения реакции окисления маннита в анаэробных условиях.

Среду готовят из сухого препарата с индикатором ВР и маннитом по прописи на этикетке. Среду разливают в пробирки по 12 - 15 мл.

6.27. Среда Плоскирева из сухих питательных сред.

Среду готовят по прописи на этикетке.

6.28. Висмут-сульфит агар (среда Вильсон-Блера).

Среду готовят по прописи на этикетке. Изготовленную и разлитую в стерильные чашки Петри среду можно хранить в холодильнике при +4 град. С до 10 суток.

6.29. Среда для определения ферментации мальтозы.

Среду готовят из сухого препарата с индикатором ВР и мальтозой по прописи на этикетке. Среду разливают в пробирки по 2 - 3 мл.

7. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ВЫПУСКАЕМЫЕ В ГОТОВОМ ВИДЕ

№ п/п	Название среды	Изготовитель
1.	Сухой питательный агар	ДагНИИПС (г. Махачкала)
2.	Сухой питательный бульон	—"
3.	Агар Эндо	—"
4.	Агар с эозин-метиленовым синим (Левина)	—"
5.	Висмут-сульфит агар	—"
6.	Бактоагар Плоскирева	—"
7.	Препараты с индикатором ВР и сахарами: - с глюкозой - с лактозой - с мальтозой - с сахарозой - с многоатомным - спиртом маннитом	—" —" —" —" —" —"
8.	Среда КОДА	—"

9.	Среда Клиглера	МНИИВС им. Мечникова (г. Петрово-Дальнее, Московская область)
10.	Солевой агар	—"
11.	Бульон Хоттингера	ИЭМ им. Гамалеи АМН СССР, г. Москва
12.	Сухая цитратная плазма кролика	Белорусский ИЭМ, г. Минск

8. НАТУРАЛЬНЫЕ ПРОДУКТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

1. Молоко коровье
2. Яйца куриные

9. СПЕЦИФИКАЦИЯ ПРИМЕНЯЕМЫХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКТИВОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

№ п/п	Техническое, фармацевтическое или торговое название материала	№ ГОСТ, ОСТ или статьи фармакопеи	Квалификация	Примечание
1	2	3	4	5
1.	Агар микробиологический	17206-71	Высший сорт	
2.	Бульон мясо-пептонный	20730-75		
3.	Бромтимоловый синий, инд.	ТУ 6-09-2086-72	ч.д.а.	
4.	Вода дистиллированная стерильн.	67-09-72		
5.	Д-глюкоза	6038-74	х.ч.	
6.	Желчь крупного рогатого скота, сухая или нативная			
7.	Калий фосфорнокислый двузамещенный	2493-75	х.ч.	
8.	Калий фосфорнокислый однозамещенный	4198-75	х.ч.	
9.	Лактоза	6038-74	х.ч.	
10.	Маннит	8321-74	х.ч.	
11.	Магний сернокислый	4523-67	х.ч.	

12.	Магний хлористый	4209-67	х.ч.	
13.	Мочевина	6691-67	х.ч.	
14.	Метиловый красный	5853-51	х.ч.	
15.	Натрий едкий	11078-71		
16.	Натрий серноватистокислый (тиосульфат)	4215-66	х.ч.	
17.	Натрий хлористый	4233-77	х.ч.	
18.	Натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный	11773-66	х.ч.	
19.	Натрий фосфорнокислый однозамещенный	245-66	х.ч.	
20.	Натрий лимоннокислый трехзамещенный	222-80-76	х.ч.	
21.	Натрий-аммоний фосфорнокислый	4170-68	х.ч.	
22.	Натрий двууглекислый	4201-66	х.ч.	
23.	альфа-Нафтол	5838-70	х.ч.	
24.	Пептон ферментативный	13805-76		
25.	Спирт этиловый ректификованный	5964-67		96 град.
26.	Сахароза	5833-75		
27.	Реактивы для окраски по Граму	18963-73		
28.	Фосфорная кислота (орто)	6552-58	х.ч.	
29.	Фуксин кислый, инд.	ТУ 200254	х.ч.	
30.	Феноловый красный	4599-73	х.ч.	