

Утверждаю
Заместитель Главного
государственного
санитарного врача СССР
А.И.ЗАИЧЕНКО
31 августа 1987 года

Вводятся
по всей территории СССР
с момента издания

**НОРМАТИВЫ И МЕТОДЫ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПРОДУКТОВ
ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ НА МОЛОЧНЫХ КУХНЯХ
СИСТЕМЫ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**

СанПин 42-123-4423-87

Разработаны: Главным санитарно-эпидемиологическим управлением Минздрава СССР (отдел гигиены питания Л.В. Селиванова, Л.Н. Майорова), Институтом питания АМН СССР (И.Б. Куваева, Л.И. Петрушина, С.А. Шевелева).

**ОБЩЕСОЮЗНЫЕ САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЕ
И САНИТАРНО-ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИЕ ПРАВИЛА И НОРМЫ**

Настоящие Правила разработаны и утверждены на основе Положения о государственном санитарном надзоре СССР ([п. 7а](#)), утвержденного Постановлением Совета Министров СССР от 31.05.73 N 361.

Ответственность за нарушение санитарного законодательства установлена [статьей 55](#) Федерального закона от 30.03.1999 N 52-ФЗ.

Нарушение санитарно-гигиенических и санитарно-противоэпидемических правил и норм влечет дисциплинарную, административную или уголовную ответственность в соответствии с законодательством Союза ССР и союзных республик ([статья 18](#)).

По вопросу, касающемуся осуществления государственного надзора в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, см. [главу VI](#) Федерального закона от 30.03.1999 N 52-ФЗ.

Государственный санитарный надзор за соблюдением санитарно-гигиенических и санитарно-противоэпидемических правил и норм государственными органами, а также всеми предприятиями, учреждениями и организациями, должностными лицами и гражданами возлагается на органы и учреждения санитарно-эпидемиологической службы Министерства здравоохранения СССР и министерств здравоохранения союзных республик ([статья 19](#)) (Основы законодательства Союза ССР и союзных республик о здравоохранении, утвержденные Законом СССР от 19 декабря 1969 г. и введенные в действие с 1 июля 1970 г.).

В целях охраны здоровья детей первого года жизни в СССР устанавливаются нормативы и методы микробиологического контроля продуктов детского питания, изготовленных на молочных кухнях системы здравоохранения.

Настоящие Правила определяют нормативы и методы микробиологического контроля продуктов детского питания, изготовленных на молочных кухнях системы здравоохранения;

предназначаются для учреждений санитарно-эпидемиологической службы Министерства здравоохранения СССР. С утверждением настоящих Санитарных правил утрачивает силу п. 55 Санитарных правил для детских молочных кухонь N 942-71 от 25 ноября 1971 г.

В связи с повышенной восприимчивостью детей раннего возраста к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам настоящие Правила включают расширенный спектр микробиологических показателей, нормируемых в продуктах детского питания, изготовленных на молочных кухнях.

Учитывая необходимость повышения эффективности микробиологического контроля за качеством и безопасностью продуктов детского питания, в Санитарные правила введены усовершенствованные в соответствии с рекомендациями ФАО/ВОЗ методы анализа нормируемых групп микроорганизмов. Методы адаптированы к условиям работы СЭС.

Результаты микробиологических анализов могут быть получены через 48 - 96 часов, т.е. в сроки, когда продукция молочных кухонь уже реализована. Поэтому микробиологический контроль качества продуктов, изготовленных детскими молочными кухнями, является ретроспективным методом и служит целям объективной оценки санитарно-гигиенического содержания молочных кухонь, соблюдения технологического процесса и правил личной гигиены персоналом.

1. Микробиологические нормативы для продуктов детского питания, изготовленных на молочных кухнях

1.1. Микробиологические нормативы для всех видов продуктов детского питания, изготовленных на молочных кухнях, приведены в табл. 1, 2, 3, 4.

Таблица 1

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ ДЛЯ СТЕРИЛИЗОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ <*>

<*> Дрожжи и плесневые грибы в 1 куб. см готовых продуктов не допускаются. Анализ проводят по ГОСТ 26888-86.

N п/п	Наименование продукта	Возраст детей	Мезо- фильные аэробные и фак. анаэроб- ные мик- роорга- низмы в 1 куб. см, КОЕ, не более	Не допускаются в массе продукта			
				БГКП	E. coli	S. aureus	пато- генные, в т.ч. сальмо- неллы
1.	Смесь адаптиро- ванная стерили- зованная "Ма- лютка"	с пер- вых дней жизни до 3 мес.	100	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см
2.	Смесь адаптиро- ванная восста- новленная "Ма- лютка"	с пер- вых дней жизни	100	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см

3.	Стерилизованная молочная смесь "Виталакт"	с первых дней жизни	100	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см
4.	Молоко стерилизованное цельное	с 6 месяцев	100	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см
5.	Молоко стерилизованное витаминизированное	с 6 месяцев	100	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см
6.	Сливки стерилизованные	с 4,5 месяцев (в пюре)	100	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см

Таблица 2

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ
ДЛЯ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ**

N п/п	Наименование продукта	Возраст детей	Не допускаются в массе продукта			
			БГКП	E. coli	S. aureus	патогенные, в т.ч. сальмонеллы
1.	Адаптированная ацидофильная смесь "Малютка" <*>	с первых дней жизни до 6 мес.	в 3 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 50 куб. см
2.	Кисломолочный "Виталакт" (ВК-1)	с 2 мес. до 1 года	в 3 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 50 куб. см
3.	Кефир детский	с 5 мес.	в 3 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 50 куб. см
4.	Бифилин <***>	с первых дней жизни до 6 мес.	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 50 куб. см
5.	Биолакт	с первых дней жизни	в 3 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 50 куб. см
6.	Биолакт обогащенный	с первых дней жизни	в 3 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 50 куб. см
7.	Лактобактерин кисломолочный		в 3 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 50 куб. см
8.	Антацидный бифилакт		в 3 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 50 куб. см

9.	"Балдырган"	с первых дней жизни	в 3 куб. см	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см
----	-------------	------------------------	----------------	-----------------	-----------------	------------------

<*> Правильно приготовленная ацидофильная смесь "Малютка"⁷ должна содержать в 1 куб. см не менее 10 лактобацилл.

<*> Правильно приготовленный бифилин⁸ должен содержать в 1 куб. см⁹ 10 - 10 бифидобактерий.

Таблица 3

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ ДЛЯ ЗАКВАСОК <*>

<*> Микробиологические нормативы и методы исследования заквасок для бифилина, биолакта, ацидофильной смеси "Малютка" и др. кисломолочных продуктов, перечисленных в [таблице 2](#), контролируют в соответствии с ТУ на каждый вид продукта, кроме того, *S. aureus* должны отсутствовать в 10 куб. см этих заквасок, а патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы) - в 100 куб. см.

N п/п	Наименование закваски	Не допускаются в массе продукта			Микроскопический препарат <*>
		БГКП	<i>S. aureus</i>	патогенные микроорга- низмы, в том числе саль- монеллы	
1.	Для кефира детского	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см	Молочно-кислые стрептококки, единичные клетки дрожжей и палочек. Посторонняя микрофлора долж- на отсутствовать
2.	Для творога детского	в 10 куб. см	в 10 куб. см	в 100 куб. см	Молочно-кислые стрептококки

<*> Контроль качества заквасочных культур осуществляется путем просмотра микроскопического препарата в соответствии с действующей Инструкцией по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности. М., 1978.

Таблица 4

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ ДЛЯ ПАСТООБРАЗНЫХ ПРОДУКТОВ, ГОТОВЫХ КАШ, НАПИТКОВ

N	Наименование	Возраст	Мезо-	Не допускаются в массе
---	--------------	---------	-------	------------------------

п/п	продукта	детей	фильные аэробные и фак. анаэроб- ные КОЕ/г (куб. см), не более	продукта			
				БГКП	E. coli	S. aureus	пато- ген- ные, в т.ч. саль- монел- лы
1.	Творог детский Ацидофильная паста	с 6 ме- сяцев	-	в 1 г	-	в 1 г	в 50 г
2.	Низкокалорийная белковая паста	с 6 ме- сяцев	-	в 1 г	-	в 1 г	в 50 г
3.	Творог кальци- нированный	со 2-го месяца	100	в 10 г	-	в 1 г	в 50 г
4.	Готовые молоч- ные каши: греч- невая, овсяная, манная	с 4 - 5 месяцев	3 10	в 1 г	-	в 1 г	в 50 г
5.	Готовые молоч- ные каши из му- ки: рисовой, овсяной, греч- невой	с 4 - 5 месяцев	3 10	в 1 г	-	в 1 г	в 50 г
6.	Восстановленные молочные каши ("Колосок", "Новинка", "Ма- лышка", "Кру- пинка" и т.д.)	с 4 - 5 месяцев	3 10	в 1 г	-	в 1 г	в 50 г
7.	Настой шиповни- ка, сухой чер- ной смородины и т.д.	с 3 - 4 недель	2 5 x 10	в 1 г	10 куб. см		в 50 г

1.2. Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов соответствует нормативам утвержденных ТУ для каждого вида продукта и выражается в КОЕ/г (куб. см) продукта, где КОЕ - колониеобразующие единицы, соответствуют принятому ранее обозначению "клетки". Этот показатель не определяется в кисломолочных продуктах.

1.3. Санитарно-показательные, условно-патогенные и патогенные микроорганизмы контролируются по альтернативному принципу: во всех таблицах для бактерий группы кишечных палочек (БГКП), эшерихий коли, коагулазоположительных стафилококков (S. aureus), патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл, нормируется та масса готового продукта (в граммах или куб. см), в которой перечисленные микроорганизмы не допускаются.

1.4. Оценка результатов микробиологических анализов.

1.4.1. Обнаружение повышенного количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов позволяет установить нарушения температурного режима в

процессе приготовления продукта.

1.4.2. Обнаружение бактерий группы кишечных палочек в нормируемой массе продукта указывает на неудовлетворительные санитарно-гигиенические условия при изготовлении, а присутствие эшерихий коли указывает еще и на вторичное загрязнение продукта при несоблюдении правил личной гигиены лицами, участвующими в изготовлении его.

1.4.3. Обнаружение коагулазоположительных стафилококков в готовой продукции, как правило, свидетельствует о вторичном загрязнении продукции молочных кухонь за счет вегетирования стафилококков в носоглотке и на руках работников, обсемененности этими микробами оборудования и инвентаря.

1.4.4. Более строгие требования к отсутствию патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл (и шигелл), в большой массе продукта введены для защиты детей грудного возраста от возбудителей острых кишечных инфекций; их обнаружение указывает на вторичное инфицирование продукта и на эпидемиологическое неблагополучие на молочной кухне.

1.5. Санитарно-гигиенические мероприятия, проводимые на основании результатов микробиологического контроля.

1.5.1. При обнаружении патогенных микроорганизмов - сальмонелл, шигелл проводится без предварительного оповещения бактериологическое обследование работников молочной кухни, назначается санитарный день с дезинфекцией, организуется прохождение санминимума и т.п.

1.5.2. При неудовлетворительных микробиологических показателях в стерилизованных продуктах проверяется исправность автоклавов и другой стерилизующей аппаратуры, имеющейся на молочной кухне, проверяется правильность укупоривания бутылочек и т.п.

1.5.3. При обнаружении коагулазоположительных стафилококков в нормируемой массе готовых продуктов, особенно в пастообразных, осуществляется контроль за состоянием рук работающих с отстранением от работы при наличии порезов, нарывов, царапин и т.п., а также проводится санация носоглотки работников и назначается санитарный день в молочной кухне.

1.5.4. При обнаружении бактерий группы кишечных палочек и эшерихий коли в готовых продуктах проводится внеплановый санитарно-бактериологический контроль содержания молочной кухни со взятием смывов в производственных помещениях, в стерилизационном помещении, в помещении для хранения готовой продукции, с рук и санодержки работников; проводится контроль заквасочных культур, воды, воздуха, маточных и рабочих растворов дезинфицирующих средств; назначается генеральная уборка, санитарный день; организуется прохождение санминимума.

2. Порядок проведения микробиологических исследований готовых продуктов

2.1. Микробиологический контроль продуктов детского питания, изготовленных на молочных кухнях системы здравоохранения, осуществляется санитарно-бактериологическими станциями не реже 1 раза в месяц, а при эпидемиологическом неблагополучии в регионе - не реже 1 раза в 15 дней; допускается при наличии возможностей СЭС исследование готовой продукции 1 раз в 10 дней.

2.2. Отбор проб.

2.2.1. Отбор проб продуктов детского питания производится в соответствии со СТ СЭВ 3013-81 "Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов", ГОСТ 9225-84 "Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа".

2.2.2. Пробы для микробиологических исследований отбирают до отбора проб для физико-химических исследований способом, исключающим вторичную бактериальную контаминацию.

2.2.3. Отбор проб продуктов, изготовленных на молочных кухнях и фасованных в упаковках 50 - 200 куб. см (г), производят в количестве не менее 3 - 4 единиц фасовки в оригинальной упаковке; количество отбираемого продукта должно быть достаточным для получения средней пробы массой 200 г (куб. см), закваску отбирают в условиях особо строгой асептики в количестве не менее 100 куб. см.

2.2.4. Отобранные пробы снабжают этикеткой, в которой указывают номер образца, наименование продукта, день и час отбора образца, должность и подпись лица, отобравшего образец, и наименование микробиологических анализов, которые необходимо провести в отобранной пробе.

2.2.5. Микробиологические исследования проводят тотчас или не позднее 4 час. с момента пробы при температуре хранения не выше +6 град. С.

2.3. Подготовка проб для микробиологических анализов.

2.3.1. Подготовка проб проводится в соответствии с ГОСТ 26669-85 "Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов".

2.3.2. Приготовление усредненной пробы из жидких продуктов: в стерильную плоскодонную колбу или флакон емкостью 500 куб. см с соблюдением асептики из каждой отобранной на молочной кухне бутылочки вносят по 50 - 75 куб. см жидкого продукта. Полученную усредненную пробу массой не менее 200 куб. см тщательно перемешивают круговыми движениями и используют для анализов.

2.3.3. Приготовление усредненной пробы из пастообразных продуктов: в стерильный химический стакан вносят с соблюдением правил асептики из отобранных на молочной кухне фасованных в мелкую упаковку пастообразных продуктов такое количество, чтобы масса усредненной пробы составила 150 - 200 г; пробу тщательно перемешивают стерильной фарфоровой ложкой или шпателем и используют для анализов.

2.3.4. Кисломолочные продукты и закваски перед посевом нейтрализуют до pH 7,0 - 7,2 добавлением стерильного 10% раствора двууглекислого натрия.

2.4. Методы микробиологических анализов.

2.4.1. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (общее микробное число).

2.4.1.1. Метод основан на способности мезофильных аэробов и факультативных анаэробов расти на питательных средах определенного состава при температуре 30 град. С с образованием колоний в течение 72 часов, видимых при увеличении в 2 раза. Для повышения эффективности выделения микроорганизмов из детских продуктов необходимо использовать обогащенный питательный агар, приготовленный по п. 4.2.1.

2.4.1.2. Посев продуктов проводят глубинным методом. С этой целью жидкие продукты вносят по 1 куб. см в 2 чашки Петри; из пастообразных продуктов, каш и творога кальцинированного готовят разведение 1:10 с использованием 0,1% водного раствора пептона или изотонического раствора натрия хлорида и вносят в 2 чашки

-1

Петри по 1 куб. см разведенного до 10⁻¹ продукта. Сразу (или не позднее чем через 15 мин.) после внесения материала чашки заливают расплавленным и остуженным до 45 град. С обогащенным питательным агаром. Содержимое перемешивают осторожными вращательными движениями. После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат дном вверх при 30 град. С на 72 часа (при необходимости допускается производить предварительный учет через 48 часов). Колонии подсчитывают на каждой из 2 чашек отдельно с помощью счетчика колоний или с помощью лупы, помещая чашку дном кверху на темную бумагу и отмечая на дне чашки колонии тушью или чернилами. Принимая во внимание низкую обсемененность микроорганизмами жидких продуктов детских молочных кухонь, учитывают все выросшие на двух чашках колонии; вычисляют среднюю арифметическую величину, округляют ее в соответствии с ГОСТ 26670-85. Полученная величина отражает количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 куб. см жидких стерилизованных

-1

смесей (КОЕ/куб. см). При посеве разведения 10⁻¹ среднюю арифметическую величину умножают на 10 и получают КОЕ/г продукта. Оценка результатов анализа производится в соответствии с

нормативами табл. 1 - 4.

2.4.2. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП).

2.4.2.1. К бактериям группы кишечных палочек (колиформным бактериям) в соответствии с рекомендациями ФАО/ВОЗ и СЭВ отнесены грамотрицательные, не образующие спор палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 36 ± 1 град. С. Принимая во внимание растущую роль цитратассимилирующих представителей родов семейства энтеробактерий в возникновении острых кишечных и других заболеваний у детей первого года жизни, в продуктах детского питания не допускается определение коли-титра, т.к. в последнем случае учитываются преимущественно *E. coli*, и отбрасываются цитрат-положительные варианты энтеробактерий - представители родов *Klebsiella*; *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*.

2.4.2.2. Для посева используются те количества продукта, в которых в соответствии с табл. 1 - 4 предусматривается отсутствие БГКП. Продукты жидкой консистенции засевают в среду Кесслер с лактозой (с поплавком), соблюдая соотношение продукта и среды 1:5 - 1:10, и помещают в термостат при 37 град. С на 24 - 48 часов.

2.4.2.3. При отсутствии признаков роста в жидкой среде - газообразования, помутнения или изменения цвета среды - готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При отсутствии в мазках грамотрицательных не образующих спор палочек дают заключение о соответствии исследованного продукта нормативу на БГКП.

2.4.2.4. При наличии признаков роста на среде Кесслер с лактозой проводят высев из газ-положительных и подозрительных пробирок на чашки со средой Эндо, помещают в термостат при 37 град. С на 18 - 24 часа. Посевы тщательно просматривают, и из колоний, подозрительных или типичных для БГКП (темно-красные с металлическим блеском или без него, темно-розовые, светло-розовые, сиреневатые, красные слизистые и т.п.), готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Обнаружение грамотрицательных, не содержащих спор палочек указывает на наличие в исследуемой массе продукта бактерий группы кишечных палочек. Высев на среду Козера или Симмонса не производят, т.к. учитывают и цитрат-положительные и цитрат-отрицательные варианты БГКП. Необходимо обращать особое внимание на появление на среде Эндо мелких бесцветных колоний, которые характерны для возбудителей кишечных инфекций - сальмонелл, шигелл.

Примечание: иногда при высеве на среду Эндо может наблюдаться рост очень мелких, практически пылевидных темно-красных колоний, в мазках из которых обнаруживаются грамположительные диплококки.

2.4.3. Определение эшерихий коли.

2.4.3.1. Метод основан на способности эшерихий коли ферментировать лактозу с образованием кислоты и газа при температуре $(44,5 \pm 0,5)$ град. С в течение 24 - 48 часов. Идентификацию эшерихий коли проводят по следующим признакам: образование индола, положительная реакция с метиловым красным, отрицательная реакция Фогес-Проскауэра (отсутствие образования ацетилметилкарбинола) и отсутствие способности утилизировать цитрат.

2.4.3.2. Посев жидких стерилизованных продуктов: 10 куб. см продуктов, перечисленных в табл. 1, вносят в колбу емкостью 200 куб. см, содержащую 90 куб. см среды Кесслер с лактозой, помещают в термостат при температуре $(44,5 \pm 0,5)$ град. С на (24 ± 1) час. Так же высевают напитки, не имеющие кислого pH.

2.4.3.3. Посев кисломолочных продуктов: в колбу емкостью на 200 куб. см вносят 10 куб. см кисломолочного продукта, предварительно нейтрализованного, добавляют 90 куб. см среды Кесслер с лактозой и помещают в термостат при $(44,5 \pm 0,5)$ град. С на (24 ± 1) час.

2.4.3.4. Колбы просматривают: при отсутствии признаков роста делают мазки, окрашивают и микроскопируют. При отсутствии в мазках грамотрицательных не образующих спор палочек дают заключение об отсутствии эшерихий коли в 10 куб. см исследованного продукта.

2.4.3.5. Колбы, в которых обнаружены признаки роста (помутнение среды, газообразование, изменение цвета среды), подвергают дальнейшему исследованию. Из этих колб производят посев штрихом и рассевом на поверхность подсушенной плотной среды Эндо в чашках Петри так, чтобы получить изолированные колонии. Посевы выдерживают в термостате при (37 ± 1) град. С в

течение (24 +/- 1) час.

Эшерихии на среде Эндо имеют колонии темно-красные с металлическим блеском или без него. Из типичных колоний готовят мазки. Если при окрашивании по Граму и микроскопировании подтверждается наличие грамтрицательных бесспоровых палочек, то все типичные колонии подвергаются идентификации по перечисленным в п. 2.4.3.6 тестам.

2.4.3.6. Идентификация эшерихий коли.

2.4.3.6.1. Реакция на индол. Из типичной изолированной колонии на среде Эндо производят высев в пробирку с бульоном на индол (4.2.2.5). Пробирки выдерживают в термостате при температуре (37 +/- 1) град. С в течение (24 +/- 1) час.

После выдерживания в термостате в пробирку с индольной средой добавляют 5 - 10 капель реактива Эрлиха (п. 4.2.2.6). Появление темно-красного окрашивания в поверхностном слое свидетельствует об образовании индола.

2.4.3.6.2. Реакция Фогес-Проскауэра.

Типичную, хорошо изолированную колонию пересевают в пробирку со средой Кларка (п. 4.2.2.7). Выдерживают в термостате при температуре (37 +/- 1) град. С в течение (48 +/- 3) час. Вынимают пробирки из термостата, и из каждой из них пипеткой стерильно отбирают (1,0 +/- 0,01) куб. см культурной жидкости в чистые пробирки. Затем к 1 куб. см добавляют (0,60 +/- 0,01) куб. см 5-процентного раствора альфанафтола (п. 4.2.2.10) и (0,20 +/- 0,01) куб. см 40-процентного раствора гидроксида калия (п. 4.2.2.11), хорошо перемешивают. Появление красного окрашивания в первые 5 мин. свидетельствует о положительной реакции (образование ацетона).

2.4.3.6.3. Реакция с метиловым красным.

В пробирки с оставшейся средой Кларка добавляют по 5 капель реактива метилового красного в каждую пробирку. Четкое красное окрашивание указывает на положительную реакцию.

2.4.3.6.4. Утилизация цитратов.

Производят пересев из типичных колоний со среды Эндо на чашки Петри с подсушенной средой Симмонса (или в пробирки со средой Козера (п. п. 4.2.2.12 и 4.2.2.14). Посевы выдерживают в термостате при (37 +/- 1) град. С в течение 24 - 48 час. При учете результатов обращают внимание на наличие роста и изменение цвета среды.

Наличие роста и изменение цвета среды из зеленого в синий или желтый характерно для цитрат-положительных культур.

Для цитрат-отрицательных разновидностей характерно отсутствие роста и изменения цвета среды.

2.4.3.7. Обработка результатов идентификации.

Обработка результатов идентификации типичных колоний проводится согласно нижеследующей таблице:

КЛАССИФИКАЦИЯ КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ ПО ИМАЦ-ТЕСТАМ

Образование индола	Реакция с метиловым красным	Реакция Фогеса-Проскауэра	Утилизация цитратов	Тип бактерий
+	+	-	-	Типичные эшерихии коли
-	+	-	-	Атипичные эшерихии коли
-	-	+	+	Типичные энтеробактерии аэрогенес
+	-	+	+	Атипичные энтеробактер аэрогенес
+	+	-	+	Типичные цитробактер
-	+	-	+	Атипичные цитробактер

2.4.3.8. При обнаружении в исследуемой массе (объеме) продукта граммотрицательных неспорообразующих палочек, сбрасывающих лактозу при 44,5 град. С, образующих и не образующих индол, дающих положительную реакцию с метилрот и отрицательную на ацетонин и не утилизирующих цитрат, дают заключение о несоответствии нормативу по этому показателю.

2.4.4. Определение коагулазоположительных стафилококков (*S. aureus*).

2.4.4.1. Метод основан на способности коагулазоположительных стафилококков расти и образовывать зону просветления вокруг колоний на специальных селективных средах с яичным желтком.

С целью унифицирования метода выделения стафилококков из пищевых продуктов и приближения формулы питательной среды к международной в Институте питания АМН СССР разработан вариант агара типа Байрд-Паркер, близкий по своим свойствам к оригиналу. Для изготовления агара типа Байрд-Паркер используются отечественные реактивы и питательные основы (см. п. 4.2.3.2). Эта среда особенно рекомендуется для выделения стафилококков из продуктов, подвергнутых термической обработке. Преимущество этой среды состоит в том, что с ее применением можно выделять и учитывать стафилококки из большой ассоциации микробов. Под действием ингибирующих веществ среды рост многих представителей сопутствующей микрофлоры полностью угнетается либо изменяется морфология и окраска колоний микроорганизмов.

2.4.4.2. Посев жидких продуктов: в две колбы емкостью 200 куб. см, содержащие по 90 куб. см солевого или сахарного бульона, стерильной пипеткой вносят по 10 куб. см продукта, тщательно смешивают и помещают в термостат при (37 +/- 1) град. С на 18 - 24 часа.

2.4.4.3. Посев пастообразных продуктов (см. табл. 4): из усредненной пробы делают навески, равные 1 г, помещают в пробирки с 9 куб. см солевого и сахарного бульона, хорошо размешивают и термостатируют по п. 2.4.4.2.

2.4.4.4. После термостатирования из бульонов производят посев на чашки Петри с подсушенным агаром типа Байрд-Паркер или ЖСА (п. п. 4.2.3.2 и 4.2.3.3). Посевной материал в количестве 0,1 куб. см (2 капли) равномерно распределяют шпателем по поверхности агара. Чашки с посевами вверх дном инкубируют при (37 +/- 1) град. С в течение 24 - 48 часов.

2.4.4.5. Учет результатов: плазмокоагулирующие стафилококки (*S. aureus*) на среде типа Байрд-Паркер растут в виде черных, блестящих, выпуклых колоний в диаметре 1 - 1,5 мм, окруженных зоной просветления среды шириной 1 - 3 мм. Около 90% стафилококкус ауреус, выделенных из пищевых продуктов, и штаммы, образующие энтеротоксин, на агаре типа Байрд-Паркер дают зоны просветления через 24 часа инкубации при 37 град. С. Эти колонии не требуют подтверждения в принадлежности к *S. aureus* и подлежат учету через 24 часа инкубации.

2.4.4.6. При обнаружении вышеописанных колоний дают заключение о наличии *S. aureus* в засеянной массе продукта и несоответствии его нормативу.

2.4.4.7. При росте типичных по морфологии (п. 2.4.4.5) колоний, но без зон просветления их подвергают изучению в реакции плазмокоагуляции с плазмой крови кролика. При положительной реакции дают заключение о наличии *S. aureus* в засеянной массе продукта и его несоответствии нормативу.

2.4.4.8. Примечание: некоторые представители семейства Enterobacteriaceae, энтерококков, микрококков растут на среде Байрд-Паркер, образуя черные колонии, но при этом ни один из этих микроорганизмов не образует характерных зон просветления на среде с желтком. На этой среде также могут расти дрожжи, плесени, бациллы, но их легко различить по серой окраске и по измененной форме колоний.

2.4.4.9. Учет результатов на желточно-солевом агаре (ЖСА) и изучение выделенных культур, подозрительных на *S. aureus*, проводится общепринятым методом.

2.4.4.10. Постановка реакции плазмокоагуляции.

Не менее 5-ти характерных колоний, подозрительных на стафилококки, с каждой чашки намечают для дальнейшего исследования, из которых приготавливают мазки-препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. Колонии грамположительных мелких кокков, расположенных в мазке гроздьевидно, отсеивают в пробирки со скошенным мясopептонным агаром (п. 4.1.3), пробирки с посевами выдерживают в термостате при (37 +/- 1) град. С в течение

18 - 24 часов. Из культур, выросших на скошенном МПА, после предварительной проверки мазка на чистоту под микроскопом, ставят реакцию плазмокоагуляции: в пробирку с (0,50 +/- 0,01) куб. см разведенной кроличьей плазмы (п. 4.2.3.5) вносят петлю суточной агаровой культуры. Одну пробирку с плазмой оставляют незасеянной, а в другую засевают заведомо коагулазоположительный стафилококк в качестве контролей.

Пробирки помещают в термостат при температуре (37 +/- 1) град. С.

Учитывают результаты через 2, 4 часа и оставляют до утра при комнатной температуре для окончательного учета. Ускорение реакции производят за счет использования 3 - 4-часовых бульонных культур стафилококков, добавляя их по (0,10 +/- 0,01) куб. см в (0,50 +/- 0,01) куб. см разведенной цитратной плазмы.

Пробирки на свертывание плазмы следует просматривать осторожно, чтобы не разрушить начало образования сгустка.

При учете реакции плазмокоагуляции могут наблюдаться три степени активности фермента коагулазы:

++++ - сгусток плотный;

+++ - сгусток, имеющий небольшой отсек;

++ - сгусток, в виде взвешенного мешочка.

Все три варианта являются положительным результатом.

2.4.4.11. Обработка результатов:

- положительная реакция плазмокоагуляции свидетельствует о присутствии коагулазоположительных стафилококков в засеянной массе (объеме) продукта;

- отрицательная реакция плазмокоагуляции свидетельствует об отсутствии коагулазоположительных стафилококков в засеянной массе (объеме) продукта.

2.4.4.12. Примечание.

При обнаружении значительного роста коагулазоотрицательных стафилококков в исследуемом продукте микробиолог должен обратить внимание на санитарно-гигиеническое содержание молочной кухни, т.к. у детей грудного возраста некоторые варианты коагулазоотрицательных стафилококков (*S. epidermidis*) также способны вызывать острые стафилококковые энтериты.

2.4.5. Определение сальмонелл.

Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не должны обнаруживаться в той массе продукта, которая указана в табл. 1, 2, 3, 4.

2.4.5.1. Метод основан на использовании сред обогащения для увеличения роста сальмонелл, их выделения на специальных агаровых средах с последующим проведением серологических реакций.

2.4.5.2. Проведение анализа.

При исследовании стерилизованных жидких смесей и продуктов объем (масса) исследуемого продукта должен составлять (100 +/- 1,0) куб. см; для кисломолочных жидких продуктов (до нейтрализации) - (50 +/- 0,5) куб. см, кроме "Балдыргана" и заквасок, где объем (100 +/- 1,0) куб. см; пастообразные продукты, готовые каши, напитки исследуются в массе (объеме) (50 +/- 0,5) куб. см (г).

2.4.5.3. В стерильных условиях в стакан вместимостью 200 куб. см отмеривают (100,0 +/- 1,0) куб. см; (50 +/- 0,5) куб. см либо отвешивают (50 +/- 0,5) г исследуемого продукта и асептически переносят в колбы вместимостью соответственно 1000,0 куб. см, 400,0 куб. см или 250,0 куб. см, содержащие (400,0 +/- 1,0) куб. см, (200 +/- 1,0) куб. см жидкой среды обогащения, соблюдая соотношение 1:5 продукта и питательной среды. Все тщательно перемешивают. При плохом растворении продукта пробы подвергают механическому встряхиванию на аппарате для встряхивания жидкостей (шуттель-аппарат). В качестве сред обогащения могут применяться магниевая среда, среда Мюллера, Кауфмана, селенитовая среда (п. п. 4.2.4.1, 4.2.4.4, 4.2.4.5, 4.2.4.6).

Допускается посев жидких продуктов в разные объемы сред обогащения двойной концентрации (1:1).

Кисломолочные продукты перед внесением в среду обогащения нейтрализуют (п. 2.3.4).

Посевы выдерживают в термостате при (37 +/- 1) град. С в течение 18 - 24 часов.

2.4.5.4. На следующий день производят высев из сред обогащения на поверхность хорошо подсушенных чашек с дифференциально-диагностическими средами Плоскирева и висмут-сульфитного агара (п. 4.2.4.7). Для получения отдельных колоний петлей берут минимальное количество посевного материала и производят посев штрихом. Чашки с посевами помещают в термостат при (37 +/- 1) град. С на 24 - 48 часов. Проверку посевов осуществляют дважды: через (24 +/- 1) и (48 +/- 3) часа после выдерживания в термостате.

2.4.5.5. Обработка результатов.

2.4.5.5.1. На среде Плоскирева колонии сальмонелл бесцветные, плотные, на висмут-сульфитном агаре - черные, с характерным металлическим блеском, при этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией.

При отсутствии типичных колоний для сальмонелл на каждой из сред конечный результат анализа записывают как отрицательный, т.е. в исследуемой массе (объеме) продукта сальмонеллы отсутствуют.

При наличии на любой из питательных сред на чашках Петри типичных или подозрительных колоний на сальмонеллы производят их дальнейшее изучение.

2.4.5.6. Из каждой среды на чашках Петри, содержащей подозреваемую колонию сальмонелл, выбирают хорошо изолированную колонию и высевает штрихом и уколом на трехсахарный агар с мочевиной (п. 4.2.4.8) или среду Клиглера (п. 4.2.4.10). Пробирки с посевами выдерживают в термостате при (37 +/- 1) град. С в течение 24 часов. Производят идентификацию культур, посеянных на среду Клиглера или трехсахарный агар с мочевиной, по ферментации лактозы, глюкозы, сахарозы и расщеплению мочевины:

- покраснение или пожелтение скошенной части столбика среды указывает на образование кислоты в результате ферментации лактозы, сахарозы или обоих сахаров;
- покраснение самого столбика указывает на расщепление глюкозы;
- восстановление цвета среды до исходного (бледно-розовый) свидетельствует о расщеплении мочевины;
- почернение среды в столбике свидетельствует об образовании сероводорода.

Механизм действия среды Клиглера идентичен с трехсахарным агаром (за исключением мочевины, которая в данной среде отсутствует).

2.4.5.7. Трактовка результатов.

Если культуры сбраживают лактозу с образованием газа и расщепляют мочевины, они не принадлежат к бактериям рода сальмонелла.

Культуры, не ферментирующие лактозу и не расщепляющие мочевины, но ферментирующие глюкозу (с образованием или без образования газа), подвергаются дальнейшему изучению (культуры, ферментирующие глюкозу без образования газа, подозрительны как брюшнотифозные или дизентерийные; культуры, ферментирующие глюкозу с образованием газа, дающие в среде пузырьки и продуцирующие сероводород <*>, могут принадлежать к бактериям рода сальмонелла).

<*> Среди бактерий рода сальмонелла встречается до 15% штаммов, не продуцирующих сероводород.

Если ни в одной из пробирок не обнаружено ни одной характерной для сальмонелл реакции, то результат считают отрицательным и дают заключение об отсутствии в исследуемой массе (объеме) продукта бактерий рода сальмонелла.

2.4.5.8. Если обе пробирки покажут типичную для сальмонелл окраску сред, проводят серологическое исследование. Для этой цели берут петлей небольшое количество культуры из пробирок с трехсахарным агаром или средой Клиглера, эмульгируют в капле физиологического раствора на предметном стекле. Добавляют каплю поливалентной сальмонеллезной О-сыворотки (п. 4.2.4.11) к раствору и осторожно покачивают предметное стекло, чтобы смешать жидкости.

Положительная реакция на сальмонеллы (агглютинация) наблюдается в течение 30 - 60 сек. Обязательна постановка отрицательной контрольной реакции (культура + физиологический раствор).

Если при проведении серологического исследования агглютинации не обнаруживается, конечный результат записывают как отрицательный. Любая агглютинация, которая появляется на стекле, говорит о вероятности присутствия сальмонелл.

2.4.5.9. При выделении культур грамотрицательных палочек, ферментирующих глюкозу с образованием или без образования газа, не ферментирующих лактозу и сахарозу, образующих или не образующих сероводород и обладающих четкой серологической характеристикой, считают, что в исследуемой массе (объеме) продукта присутствуют бактерии рода сальмонелла.

3. Аппаратура, материалы и реактивы

3.1. Для всех методов микробиологических исследований применяются следующие приборы, материалы и реактивы:

автоклав вертикальный по ГОСТ 9586-75, или др. марки, или получаемый по импорту;

анализатор потенциометрический, диапазон измерения pH от 7,00 до 8,00 с погрешностью не более $\pm 0,05$ по ГОСТ 19881-74, или иономер универсальный ЭВ-74, или потенциометр универсальный pH-340;

аппарат универсальный типа АБУ-6С для встряхивания жидкостей в колбах и пробирках по ТУ 64-1-2451-78 (шуттель-аппарат);

аппарат для измельчения тканей с числом оборотов не менее 8000 об./мин. и не более 45000 об./мин.;

баня водяная с обогревом;

весы лабораторные 2 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-80;

лупа измерительная по ГОСТ 8309-75;

микроскоп биологический по ГОСТ 8284-78, или другой марки, или полученный по импорту;

стерилизатор СС-200 М по ТУ 64-1-2498-75 или другой марки;

термостат с водяной рубашкой электрический ЗЦ-1125 М по ТУ 64-1-1868-75, или термостат электрический суховоздушный ТС-80 по ТУ 64-1-1382-72, или получаемый по импорту;

прибор для счета колоний бактерий ПСБ по ТУ 64-1-2401-72;

холодильник электрический бытовой по ГОСТ 16317-76 или получаемый по импорту;

карандаши по стеклу;

колбы конические вместимостью 40, 200, 400, 1000, 1600 куб. см по ГОСТ 19908-80;

ножи;

ножницы;

посуда мерная лабораторная стеклянная по ГОСТ 1770-74;

пипетки исполнения 5, 1-го класса точности, вместимостью 1, 2 куб. см по ГОСТ 20292-74 или 2-го класса точности по ГОСТ 1770-74;

пипетки исполнения 7, 1-го класса точности, вместимостью 10 куб. см по ГОСТ 20292-74 или 2-го класса точности по ГОСТ 1770-74;

пробирки исполнения ПК, вместимостью 20 куб. см по ГОСТ 19908-80;

спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 190-74;

стаканчики для взвешивания (бюксы) по ГОСТ 7148-70;

стаканы типа ВН-100, вместимостью 100 куб. см по ГОСТ 19908-80;

ступки фарфоровые по ГОСТ 9147-73;

цилиндры исполнения 1, вместимостью 100, 500 куб. см по ГОСТ 1770-74;

чашки биологические (Петри) по ГОСТ 10973-75;

бумага индикаторная универсальная по ТУ 6-09-1181-76;

вата по ГОСТ 5556-81;

марля по ГОСТ 9412-77;

пробки ватные;

штативы для пробирок;

агар микробиологический по ГОСТ 17206-71;

агар питательный сухой по ТУ 42-14-33-75;

вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;

вода питьевая по ГОСТ 2874-82;
гидролизат казеина панкреатический по ТУ 42-14-1-74;
Д-глюкоза, ч., по ГОСТ 6038-79;
калий фосфорнокислый однозамещенный, х.ч. или ч.д.а., по ГОСТ 4198-75;
кислота соляная, ч.д.а., по ГОСТ 3118-77; плотн. 1,190 г/куб. см, 1 н раствор;
масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739-78;
натрия гидроокись, х.ч. или ч.д.а., по ГОСТ 4328-77, 1 н раствор;
стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284-75;
спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ 5962-67;
спирт этиловый ректифицированный технический по ГОСТ 18300-72;
экстракт кормовых дрожжей по ТУ 42-14-56-76.

3.2. Дополнительные материалы и реактивы для определения бактерий группы кишечных палочек:

пробирки Уленгута (поплавки);
пробирки стеклянные исполнения Ш и П2 по ГОСТ 10515-75;
стаканы высокие с носиком вместимостью 200 куб. см по ГОСТ 19908-80;
среда Кесслер сухая по ТУ 49-365-76 с учетом Изменения N 2 от 01.05.85;
бромтимоловый синий, ч.д.а., по ТУ 6-0922086-77;
желчь сухая по ОСТ 49-278-75 или желчь нативная крупного рогатого скота, стерильная;
кристаллический фиолетовый, ч.д.а., по ТУ 6-09-4119-75;
культура бактерий группы кишечных палочек (контрольный штамм);
магний сернокислый по ГОСТ 4523-77;
лактоза по ОСТ 49-63-73;
натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;
натрий-аммоний фосфорнокислый по ГОСТ 4170-78;
натрий лимонно-кислый по ГОСТ 22280-76;
натрий сернокислый по ГОСТ 903-76;
бумага индикаторная универсальная по ТУ 6-09-1181-76;
среда Эндо сухая по ТУ 49-876-82;
пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805-76;
фуксин основной по МРТУ 6-09-6436-69.

3.3. Дополнительные материалы и реактивы для определения эшерихий коли:

пробирки Уленгута (поплавки);
агар в волокнах или в порошке по ГОСТ 17206-71 или получаемый по импорту;
бромтимоловый синий, ч.д.а., по ТУ 6-09-2086-77;
гидролизат казеина панкреатический по ТУ 42-14-1-74;
д-лактоза, 1-водная, ч., по ТУ 6-09-2293-79 или лактоза по ОСТ 4963-73;
д-глюкоза, ч., по ГОСТ 6038-79;
желчь сухая по ОСТ 49-278-75 или желчь нативная крупного рогатого скота, стерильная;
бумага индикаторная универсальная по ТУ 6-09-1181-76;
йод по ГОСТ 4159-79, ч.д.а., 5-процентный спиртовой раствор;
кислота соляная, х.ч., по ГОСТ 3118-77, 1 н раствор;
калий йодистый, ч.д.а., по ГОСТ 4232-74, 0,5-процентный раствор;
кристаллический фиолетовый, ч.д.а., по ТУ 6-09-4119-75;
калий фосфорнокислый однозамещенный, ч., по ГОСТ 4198-75;
калия гидроокись по ГОСТ 24363-80, 40-процентный раствор;
культура эшерихии коли (контрольный штамм);
метиловый красный, ч.д.а., по ГОСТ 5853-51;
магний сернокислый, ч., по ГОСТ 4523-77;
медь сернокислая, 5-водная, х.ч., по ГОСТ 4165-78;
натрий аммоний фосфорнокислый, двузамещенный, 4-водный, ч. или х.ч., по ГОСТ 4170-78;
натрий хлористый, ч., или х.ч., или ч.д.а., по ГОСТ 4233-77;

натрия гидроокись, х.ч. или ч.д.а., по ГОСТ 4328-77, 1 н раствор;
натрий лимоннокислый трехзамещенный, ч.д.а., по ГОСТ 22280-76;
альфа-нафтол, ч., по ГОСТ 5838-79;
пара-диметиламинобензальдегид, ч., по ТУ 6-09-3272-77;
среда Кесслер сухая с лактозой по ТУ 49-365-76 с учетом Изменения N 2;
агар Эндо сухой по ТУ 49876-82;
триптофан по ТУ 6-09-1492-80;
фуксин основной по МРТУ 6-09-6436-69;
пептон сухой ферментативный по ГОСТ 1385-76.

3.4. Дополнительные материалы и реактивы для определения коагулазоположительного стафилококка:

плазма кролика сухая, выпускаемая Белорусским ИЭМ или др. производства;
яйцо куриное диетическое;
сухой питательный агар на основе ферментативного гидролизата кормовых дрожжей;
калия теллурит, 2-процентный раствор стерильный, производства Объединения "Мосхимфармпрепараты" им. Семашко;
литий хлористый, х.ч., ТУ 6-09-3751-74; 1-водный;
натрия пируват, ч., ТУ 6-09-08-990-75;
изотонический раствор натрия хлорида, стерильный.

3.5. Дополнительные материалы и реактивы для определения сальмонелл:

бутыли стеклянные по ГОСТ 5717-81;
кастрюли эмалированные по ГОСТ 24788-81;
целлофан (пленка полиэтиленцеллофановая), ОСТ 6-06-114-79;
дрожжи прессованные по ГОСТ 171-81;
висмут-сульфитный агар по ТУ 42.14127-78;
железо сернокислое;
д-глюкоза, ч., по ГОСТ 6038-79;
д-лактоза, 1-водная, ч., ТУ 6-09-2293-79;
магний хлористый, 6-водный, ч., ч.д.а., по ГОСТ 4209-77;
мел химически осажденный по ГОСТ 6253-72;
мочевина, ч., по ГОСТ 6691-77;
натрий хлористый, ч., ч.д.а., х.ч., ГОСТ 4233-77;
натрий серноватистокислый, ч.д.а., СТ СЭВ 223-75;
сахароза, ч.д.а., по ГОСТ 5833-75;
среда Плоскирева по МРТУ 42-154-67;
соль Мора, ч., ГОСТ 4208-72;
среда Клиглера;
сыворотка сальмонеллезная О-агглютинирующая адсорбированная по ГОСТ 16449-78;
феноловый красный ТУ 6-09-4530-77;
хлороформ технический по ГОСТ 20015-74;
культура бактерий рода сальмонелла (контрольный штамм);
бриллиантовый зеленый, ч., по ТУ 6-09-4279-76;
желчь сухая по ОСТ 49-278-75 или желчь нативная крупного рогатого скота, стерильная;
натрий кислый селенистокислый;
натрий фосфорнокислый двузамещенный, безводный;
натрий фосфорнокислый однозамещенный;
вода дистиллированная;
йод металлический;
калий йодистый, ч.д.а., ГОСТ 4232-74;
изотонический раствор натрия хлорида, стерильный.

4. Питательные среды и реактивы

4.1. Питательные среды и реактивы общего назначения.

4.1.1. Изотонический 0,85% раствор хлористого натрия.

Для приготовления изотонического раствора с pH 6,9 - 7,0 используют дистиллированную воду, pH 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 минут.

4.1.2. 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 минут.

4.1.3. Приготовление раствора двууглекислого натрия для нейтрализации проб кисломолочных продуктов, реактивов для окраски по Грамму, мясо-пептонного бульона (МПБ), мясо-пептонного агара (МПА) производят согласно ГОСТ 9225-84; ГОСТ 18963-73.

4.2. Специальные питательные среды и реактивы.

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

Сухой питательный агар производства	- 35 г
ДагНИИ питательных сред	
Экстракт кормовых дрожжей производства	- 2,5 г
МНИИВС им. Мечникова	
Глюкоза	- 1,0 г
Вода дистиллированная	- 1000,0 куб. см
pH	- 7,0.

Стерилизация в автоклаве при (121 +/- 2) град. С в течение (21 +/- 3) мин.

4.2.2. Среда и реактивы для выделения бактерий группы кишечных палочек и эшерихий коли.

4.2.2.1. Среда Кесслер с лактозой.

К 1 куб. дм водопроводной воды добавляют (10,0 +/- 0,1) г пептона и 50 куб. см желчи крупного рогатого скота. Смесь кипятят на водяной бане при помешивании 20 - 30 минут. Затем фильтруют ее через ватно-марлевый фильтр, добавляют 2,5 г лактозы, доводят объем водой до 1 куб. дм. Устанавливают pH 7,4 - 7,6, используя 1 н растворы NaOH или HCl и проверяя значение pH на потенциометре или универсальной индикаторной бумагой. Добавляют 4 куб. см 1-процентного раствора генцианового фиолетового, разливают в колбы по 90 куб. см и в пробирки по 10 куб. см, закладывают поплавки (пробирки Уленгута) отверстием книзу.

Стерилизуют при (121 +/- 2) град. С в течение 15 минут.

4.2.2.2. 1% раствор генцианового (кристаллического) фиолетового.

Взвешивают (1,0 +/- 0,01) г генцианового (кристаллического) фиолетового, помещают в мерную колбу вместимостью 100 куб. см и доливают до метки дистиллированной водой. Раствор хранят при температуре (4 +/- 1) град. С в течение 7 суток.

4.2.2.3. Среда Кесслер с лактозой из сухих питательных сред.

Среда готовится согласно прописи на этикетке банки.

4.2.2.4. Среда Эндо.

Среду Эндо производства ДагНИИ питательных сред готовят согласно прописи на этикетке банки. Изготовленную и разлитую в стерильные чашки Петри среду можно хранить при температуре (4 +/- 1) град. С до 10 суток.

4.2.2.5. Среда на индол.

Взвешивают (10,0 +/- 0,1) г сухого панкреатического гидролизата казеина (или 100,0 куб. см жидкого панкреатического гидролизата казеина с содержанием 500 мг% аминного азота), (5,0 +/- 0,1) г хлористого натрия, (1,0 +/- 0,01) г ДЛ-триптофана, растворяют в 1000 куб. см дистиллированной воды. Доводят pH до 7,0 +/- 0,1 н растворами NaOH или HCl и, измеряя значение pH на потенциометре или по универсальной индикаторной бумаге, разливают в пробирки по 5 куб. см, стерилизуют 15 минут при (121 +/- 2) град. С.

4.2.2.6. Реактив на индол (Эрлиха).

Взвешивают (5,0 +/- 0,1) г пара-диметиламинобензальдегида в стеклянном стакане вместимостью 100 куб. см, помещают в коническую колбу вместимостью 200 куб. см и растворяют в (50 +/- 1) куб. см этилового спирта. С помощью мерного цилиндра вместимостью 100 куб. см медленно добавляют (50 +/- 1) куб. см концентрированной соляной кислоты. Раствор хранят в колбе с притертой пробкой при температуре (4 +/- 1) град. С.

4.2.2.7. Среда Кларка.

Взвешивают (5,0 +/- 0,1) г пептона, (5,0 +/- 0,1) г глюкозы, (5,0 +/- 0,1) г двузамещенного фосфорнокислого калия. Растворяют ингредиенты в 950 куб. см дистиллированной воды, устанавливают pH 6,9 +/- 0,1, используют 1 н растворы NaOH или HCl, проверяя значение pH на потенциометре или универсальной индикаторной бумагой. Доводят общий объем до 1 куб. дм дистиллированной водой и фильтруют при необходимости. Разливают в пробирки по 5 куб. см, стерилизуют в течение 20 минут при (115 +/- 2) град. С.

4.2.2.8. 90% раствор этилового спирта.

Добавляют к (900 +/- 5) куб. см 96-процентного этилового спирта (60 +/- 1) куб. см дистиллированной воды в колбе емкостью 100 куб. см.

4.2.2.9. Раствор индикатора метилового красного.

Взвешивают (0,1 +/- 0,001) г индикатора метилового красного, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 500 куб. см, растворяют в (300 +/- 1) куб. см 90-процентного раствора этилового спирта (п. 4.2.2.8), добавляют до 500 куб. см дистиллированной водой. Хранят раствор в колбе с притертой пробкой при температуре (4 +/- 1) град. С.

4.2.2.10. 5% раствор альфа-нафтола.

Взвешивают (5,0 +/- 0,1) г альфа-нафтола, растворяют в (100 +/- 1) куб. см абсолютного этилового спирта. При отсутствии абсолютного этилового спирта можно использовать ректификованный этиловый спирт 96 град. Раствор должен быть свежеприготовленным.

4.2.2.11. 40-процентный раствор гидроокиси калия.

Взвешивают (40,0 +/- 0,1) г гидроокиси калия в стакане вместимостью 100 куб. см, переносят в мерную колбу вместимостью 100 куб. см, растворяют в (60,0 +/- 1) куб. см дистиллированной воды, затем доводят до метки дистиллированной водой. Раствор хранят при температуре (4 +/- 1) град. С.

4.2.2.12. Среда Козера.

Взвешивают (1,5 +/- 0,1) г натрия-аммония фосфорнокислого, (1,0 +/- 0,01) г калия фосфорнокислого двузамещенного, (0,2 +/- 0,01) г магния сульфата, (3,0 +/- 0,1) г натрия лимоннокислого трехзамещенного. Растворяют в 950 куб. см дистиллированной воды. Добавляют 10 куб. см 0,5-процентного спиртового раствора бромтимолового синего. Устанавливают pH 6,8 1 н растворами NaOH или HCl, проверяя значение pH на потенциометре. Доводят объем дистиллированной водой до метки (1 куб. дм). Разливают по 10 куб. см в пробирки, стерилизуют в течение 15 минут при (121 +/- 2) град. С.

4.2.2.13. 0,5-процентный раствор бромтимолового синего в спирте.

Взвешивают (0,5 +/- 0,01) г бромтимолового синего, помещают в мерную колбу вместимостью 100 куб. см и доводят этиловым спиртом до метки. Раствор хранят при температуре (4 +/- 1) град. С в течение 30 суток.

4.2.2.14. Среда Симмонса.

Среда готовится аналогично среде Козера (п. 4.2.2.12). Но после измерения pH в нее добавляют (20 +/- 0,1) г агара на 1 куб. дм, прогревают на водяной бане до растапливания агара, стерилизуют в течение 15 минут при (121 +/- 2) град. С. Разливают в стерильные чашки Петри или пробирки.

4.2.3. Среды и реактивы для выделения стафилококков.

4.2.3.1. Солевой бульон.

К (100 +/- 1) куб. см мясопептонного бульона (МПБ) с pH 7,2 - 7,4 в колбе вместимостью 200 куб. см добавляют (6,5 +/- 0,1) г хлористого натрия и разливают в пробирки по (10,0 +/- 0,1) куб. см. Стерилизуют в автоклаве при (121 +/- 2) град. С в течение (20 +/- 3) минут.

4.2.3.2. Агар типа Байрд-Паркер.

30 г сухого питательного агара на основе ферментативного гидролизата кормовых дрожжей, производства Дагестанского НИИ питательных сред, размешивают в 1 куб. дм дистиллированной воды, добавляют 10 г пирувата натрия, 5 г хлористого лития, тщательно перемешивают. Смесь нагревают при помешивании и кипятят в течение 1 минуты до полного растворения ингредиентов. Устанавливают pH 7,2. Разливают во флаконы объемами 100 - 200 - 300 куб. см в зависимости от потребности и стерилизуют при 121 град. С 15 минут. Среда может храниться в течение месяца в условиях холодильника. Перед употреблением в растопленную и охлажденную до 45 - 50 град. С среду с соблюдением правил асептики прибавляют (из расчета на 100 куб. см среды) 0,5 куб. см 2% раствора теллурита калия и 5 куб. см эмульсии яичного желтка. Среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри в объеме не менее 20 куб. см на чашку. Чашки со средой могут быть использованы в течение 24 часов, максимум 48 часов. Перед посевом чашки со средой подсушивают в термостате общепринятым способом.

4.2.3.3. Желточно-солевой агар (ЖСА).

Основа - солевой агар: к мясо-пептонному бульону (МПБ) с pH 7,2 - 7,4 добавляют 2% агара и 6,5% хлористого натрия, расплавляют на водяной бане, при необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают мерным цилиндром по (100 +/- 1) куб. см в колбы вместимостью 250 куб. см и стерилизуют при (121 +/- 2) град. С в течение (30 +/- 3) мин. Получают солевой агар. Вместо мясо-пептонного бульона можно использовать сухой питательный агар, добавив к нему только 6,5% хлористого натрия.

ЖСА: на (100 +/- 1) куб. см стерильного расплавленного и остуженного до (45 +/- 2) град. С солевого агара добавляют (20 +/- 0,1) куб. см эмульсии яичного желтка. После полного размешивания желточно-солевой агар разливают в стерильные чашки Петри по 20 - 25 куб. см и хранят в холодильнике до 5 - 7 дней.

4.2.3.4. Эмульсия яичного желтка.

На дно стерильной чашки Петри помещают куриное яйцо, которое тщательно протирают ватой, смоченной этиловым спиртом. Стерильным пинцетом пробивают с двух противоположных сторон яйца два отверстия. Через одно из этих отверстий полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу вместимостью 200 куб. см. К желтку постепенно добавляют (частями по 20 - 30 куб. см) 180 - 200 куб. см стерильного физиологического раствора, затем содержимое тщательно встряхивают до получения гомогенной массы.

4.2.3.5. Цитратная плазма кролика.

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

4.2.4. Среды и реактивы для выделения бактерий рода Salmonella.

4.2.4.1. Магниева среда.

Среда готовится из трех растворов <*>:

<*> При использовании среды двойной концентрации масса (объем) всех ингредиентов, кроме воды, удваивается.

I раствор:

пептон	4,2 г
хлористый натрий (NaCl)	7,15 г
дрожжевой диализат	20,0 куб. см
калий фосфорнокислый однозамещенный	1,42 г
вода дистиллированная	890,0 куб. см

II раствор:

магний хлористый кристаллический	35,7 г
вода дистиллированная	90,0 куб. см

III раствор:

0,5-процентный водный раствор
бриллиантового зеленого

0,9 куб. см.

После растворения всех ингредиентов растворы соединяют, разливают приготовленную таким образом среду в колбы и флаконы. Среду стерилизуют при (112 +/- 1) град. С в течение 30 минут.

4.2.4.2. 0,5-процентный водный раствор бриллиантового зеленого.

Для приготовления 0,5-процентного раствора взвешивают (0,5 +/- 0,01) г индикатора бриллиантового зеленого, вносят в стерильную мерную колбу вместимостью 100 куб. см и доводят стерильной дистиллированной водой до метки. Раствор хранят в холодильнике в течение 7 суток.

4.2.4.3. Дрожжевой диализат.

Взвешивают (1000 +/- 10) г свежих хлебных (прессованных) дрожжей, размешивают в (1000 +/- 1) куб. см дистиллированной воды в кастрюле до состояния гомогенной массы, которую переливают в целлофановый мешок, предварительно промытый дистиллированной водой. Мешок завязывают, обмывают под струей питьевой воды, а затем дистиллированной водой и погружают в эмалированную кастрюлю, в которую предварительно наливают (1300 +/- 1) куб. см дистиллированной воды. Мешок должен быть полностью погружен в жидкость. Диализ ведут при температуре 60 - 80 град. С в течение (6 +/- 0,5) час. За это время количество жидкости в кастрюле должно уменьшиться примерно в 2 раза. Затем жидкость из кастрюли переливают в стерильную бутылку и добавляют хлороформ (0,5% к объему жидкости) и сохраняют при (6 +/- 1) град. С до 7 месяцев.

4.2.4.4. Среда Мюллера.

К 90 куб. см стерильного мясо-пептонного бульона добавляют:

а) 4,5 г мела, предварительно простерилизованного во флаконе сухим жаром (при 160 град. С в течение 2 час.);

б) 10 куб. см раствора гипосульфита натрия (50 г чистого кристаллического гипосульфита натрия в 100 куб. см дистиллированной воды стерилизуют текучим паром в течение 30 минут);

в) 2 куб. см раствора Люголя (металлического йода 25 г, йодистого калия 20 г, дистиллированной воды 100 куб. см).

4.2.4.5. Среда Кауфмана.

К 100 мл среды Мюллера добавляют 1 мл водного раствора бриллиантового зеленого (1:1000) и 5 мл стерильной бычьей желчи. Приготовленную смесь стерилизуют текучим паром в течение 30 минут. Среда сохраняется длительное время. До стерилизации среда зеленого цвета, после стерилизации она приобретает зеленовато-коричневый тон.

4.2.4.6. Селенитовая среда накопления Лейфсона:

селенит натрия кислый	4 г
пептон импортный	5 г
фосфат натрия двузамещенный безводный	7 г
фосфат натрия однозамещенный	3 г
лактоза	4 г
дистиллированная вода	1000 мл.

Среду готовят из двух основных растворов. Прежде всего экспериментально определяют точную пропорцию двузамещенного и однозамещенного фосфата натрия, которая с используемым образцом пептона и кислого селенистокислого натрия дает pH не выше 6,9 - 7,1, что регулируется изменением соотношения фосфатов. Такая предварительная подтитровка производится всякий раз, когда меняется серия любого из входящих в среду основных ингредиентов (пептон, кислый селенистокислый натрий, фосфаты).

После установления указанных соотношений к приготовленному раствору фосфатов добавляют пептон и лактозу, разливают во флаконы по 50 мл и стерилизуют текучим паром 2 дня по 30 минут или при 112 град. С однократно в течение 30 минут.

Отдельно на стерильной воде готовят 10% раствор кислого селенита натрия. Перед началом работы на каждый флакон с 50 мл основного раствора добавляют 2 мл раствора кислого селенита

натрия. Приготовленную среду разливают в стерильные пробирки по 5 - 7 мл и закрывают плотно пригнанными пробками.

4.2.4.7. Среды Плоскирева и висмут-сульфитный агар.

Среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар (ВСА) выпускаются в сухом виде Дагестанским НИИ питательных сред; их следует готовить согласно прописям, указанным на этикетках банок. Изготовленные и разлитые в стерильные чашки Петри среды можно хранить в холодильнике до 10 суток.

4.2.4.8. Трехсахарный агар с мочевиной.

Трехсахарный агар с мочевиной готовят смешением следующих ингредиентов:

дистиллированная вода	100 куб. см
сухой питательный агар	2,5 г
лактоза	1,0 г
сахароза	1,0 г
глюкоза	0,1 г
мочевина	1,0 г
железо сернокисл. ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	0,02 г
гипосульфит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	0,03 г
0,04-процентный водный раствор фенолового красного	0,04 куб. см.

Тщательно перемешивают и устанавливают pH 7,2 - 7,4. Разливают в пробирки по 5 куб. см и стерилизуют текучим паром по 20 минут 3 дня подряд. После стерилизации среду скашивают. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет.

4.2.9. 0,4-процентный водный раствор фенолового красного.

Взвешивают (0,1 +/- 0,001) г индикатора фенолового красного, вносят в колбу вместимостью 50 куб. см и вливают (25 +/- 0,1) куб. см дистиллированной воды. Тщательно перемешивают до полного растворения. Раствор хранят в холодильнике до 7 суток.

Для получения 0,04-процентного рабочего раствора индикатора 1 куб. см 0,4-процентного раствора смешивают с 9 куб. см дистиллированной воды.

4.2.4.10. Среда Клиглера из сухих питательных сред.

Среда готовится и стерилизуется согласно прописи на этикетке. Готовую среду скашивают в пробирках так, чтобы остался небольшой столбик (не менее 3 см высотой).

4.2.4.11. Поливалентная агглютинирующая сальмонеллезная сыворотка.

Необходимые разведения сыворотки готовят перед использованием согласно прописи в прилагаемой к коробке инструкции.
