

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

И.В. Гаевский

2012 г.

Регистрационный № 020-1112



МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ И
ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ГОТОВОЙ СУХОЙ СТЕРИЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;

Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»;

Государственное учреждение «Минский городской центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

АВТОРЫ:

к.т.н., доцент Егорова З.Е., д.м.н., профессор Коломиец Н.Д.,
к.м.н., доцент Тонко О.В., Левшина Н.Н., Шуниборова Т.И.,
к.х.н. Стасевич О.В., Ханенко О.Н., Шмелева Н.Д.

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
12.12.2012
Регистрационный № 020-1112

**МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ
И ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ГОТОВОЙ СУХОЙ СТЕРИЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», УЗ «Белорусский государственный технологический университет», ГУ «Минский городской центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ: канд. техн. наук, доц. З.Е. Егорова, д-р мед. наук, проф. Н.Д. Коломиец, канд. мед. наук, доц. О.В. Тонко, Н.Н. Левшина, Т.И. Шуниборова, канд. хим. наук О.В. Стасевич, О.Н. Ханенко, Н.Д. Шмелева

Минск 2012

ГЛАВА 1 ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) устанавливает методы определения с использованием стерильной лиофилизированной среды мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*), в т. ч. колиформных бактерий, микроорганизмов рода *Salmonella* и бактерий вида *E. coli*; дрожжей, плесневых грибов, бактерий вида *V. parahaemolyticus* и *S. aureus* в пищевой и косметической продукции, а также при контроле чистоты рук персонала, воздуха производственных помещений, поверхностей технологического оборудования и инвентаря на пищевых и парфюмерно-косметических предприятиях.

2. Инструкция предназначена для применения в лабораториях пищевых и парфюмерно-косметических предприятий, осуществляющих производственный контроль сырья и готовой продукции; в лабораториях учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь, осуществляющих государственный ведомственный контроль, гигиеническую оценку и выдачу санитарно-эпидемиологических заключений, а также в лабораториях других организаций, осуществляющих в установленном порядке контроль качества пищевой и косметической продукции, а также сырья для ее производства.

ГЛАВА 2 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. Средства измерений, испытательное оборудование, вспомогательные устройства и материалы.

1.1. Средства измерений и испытательное оборудование:

- весы лабораторные общего назначения 2 и 4 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

ГОСТ 24104-2001

- лупа измерительная;

ГОСТ 25706-93

- микроскоп световой биологический;

ГОСТ 2884-78

- пипетки градуированные исполнения 1, 2 классов точности, вместимостью 1; 5; 10 см³;

ГОСТ 29227-91

- термостат с диапазоном рабочих температур 28–55°C, позволяющий поддерживать заданную температуру с допустимой погрешностью ±1°C;

ТУ 9452-002-00141798-97;

- хладотермостат воздушный ХТ 3/70-1;

ТУ РБ 100644799.002-2001

- стерилизатор паровой медицинский; ГОСТ 19569-89
- стерилизаторы медицинские паровые и воздушные; ГОСТ 27437-87
- стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры 100–220°C; ГОСТ 24437-89 по ТНПА
- гомогенизатор лабораторный.
- 1.2. Вспомогательные устройства:
- облучатель бактерицидный; ТУ 9444-011-03965956-2004
- холодильник бытовой электрический; СТБ 1499-2004
- стекла предметные для микропрепаратов; ГОСТ 6672-75
- стекла предметные для макропрепаратов; ГОСТ 6672-75
- спиртовки лабораторные стеклянные; ГОСТ 23932-90
- пробирки бактериологические; ГОСТ 25336-82
- Электроплитка бытовая. ГОСТ 14919-83
- 1.3. Материалы:
- вата медицинская гигроскопичная; ГОСТ 5556-81
- готовая к использованию хромогенная среда для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (типа Compact Dry™ TC (Total counts) или др.);
- готовая к использованию среда для определения энтеробактерий (типа Compact Dry™ ЕТВ (*Enterobacteriaceae*) или др.);
- готовая к использованию хромогенная среда для одновременного определения колиформных бактерий и бактерий вида *E. coli* (*E. coli/Coliforms*);
- готовая к использованию хромогенная среда для определения колиформных бактерий (*Coliforms*);
- готовая к использованию хромогенная среда для определения бактерий рода сальмонелла (*Salmonella*);
- готовая к использованию хромогенная среда для определения золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*);
- готовая к использованию хромогенная среда для определения парагемолитического вибриона (*V. parahaemolyticus*);
- готовая к использованию хромогенная среда для определения дрожжей и плесневых грибов (*Yeasts & Moulds*).
- 1.4. Реактивы:
- раствор натрия хлорида: ГОСТ 4233-77;
- твин-80: по ТНПА.

Могут быть использованы другие средства измерений, испытательное оборудование, вспомогательные устройства, не уступающие по техническим и

метрологическим характеристикам, указанным в настоящей Инструкции, и не влияющие на результат исследований.

ГЛАВА 3 УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

1. Требования безопасности.

1.1. При работе с реактивами и приборами должны соблюдаться требования безопасности, установленные в технических нормативных правовых актах (СП 17-129 РБ 2000, СТБ ISO 7218).

1.2. Параметры микроклимата на рабочих местах должны соответствовать требованиям санитарных правил и норм 9-80-98 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений», утвержденным постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 25.03.1999 № 12 и ГОСТ 12.1.005.

2. Требования к квалификации оператора.

2.1. К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование (медицинское или техническое), прошедшие специализацию по выявлению санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов с использованием сухих сред, изучившие правила безопасной работы в микробиологических лабораториях и настоящую инструкцию.

3. Условия выполнения измерений.

3.1. Должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха — 18–27°C;
- атмосферное давление — 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха — не более 80% при температуре 25°C.

ГЛАВА 4 ОПИСАНИЕ И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

1. Методика, описанная в настоящей Инструкции, основана на высеве определенного количества образца или его разведения на среду, инкубировании посевов, подсчете всех выросших видимых колоний.

2. Готовая стерильная сухая среда представляет собой чашку с сухой лиофилизированной средой, где содержатся необходимые питательные вещества, герметично закрытую пластмассовой крышкой, которая снимается перед посевом, закрывается после него, затем чашки со средой термостатируются при соответствующих температурах.

3. Слой сухой питательной среды покрыт специальной матерчатой сеткой, обеспечивающей превосходное впитывание и распределение исследуемых проб по поверхности среды, при этом в течение нескольких секунд сухая среда трансформируется в гель. Прозрачная крышка предохраняет среды от загрязнения при инкубации.

4. Невскрытые пакеты с сухими средами хранят при температуре 5–30°C в течение срока годности, указанного на упаковке.

5. Перед использованием среды выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин.

6. После вскрытия пакета неиспользованные сухие среды оставляют в пакете из фольги и закрывают его с помощью скрепки; повторно запечатанные пакеты могут храниться при температуре 5–30°C в течение 30 дней.

7. Среда для выявления и количественного подсчета мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов при культивировании в аэробных условиях содержат набор питательных веществ и хромогенный субстрат. Среда *Total counts* восстанавливает хромоген (2,3,5-трифенилтетразолий хлорид) в точках роста бактерий, что приводит к окрашиванию образующихся колоний в красный цвет. Некоторые бактерии могут давать на данной среде колонии другого цвета или нетипичного красного цвета.

8. Среда для выявления и количественного определения в исследуемом образце энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*) содержат модифицированный желчный агар с кристаллическим фиолетовым и нейтральным красным. На данной среде ингибируется рост грамположительных бактерий. Энтеробактерии формируют красные или пурпурные (бордовые) колонии.

9. Среда для оптимизированного выявления и количественного одновременного определения колиформных бактерий и бактерий вида *E. coli* содержат хромогенные субстраты Magenta-Gal, X-Gluc или иные. Принцип действия основан на выявлении характерного для колиформных бактерий фермента β -галактозидазы, а у *E. coli* фермента β -глюкоронидазы. В результате колонии *E. coli* окрашиваются в голубой цвет, а колонии колиформных бактерий — в красный. Рост грамположительных бактерий ингибируется. Высокая концентрация бактерий на чашке может быть причиной того, что вся поверхность, на которую производится посев, будет красного или розового цвета. В таком случае необходимо произвести разведение исследуемого образца.

10. Среда для выявления в исследуемом образце колиформных бактерий (*Coliforms*), а также их количественного подсчета содержат хромогенный субстрат X-Gal, благодаря чему колиформы формируют на данной среде голубые или зелено-голубые колонии. Рост других бактерий ингибируется.

11. Среда для оптимизированного выявления и количественного определения бактерий рода *Salmonella* состоят из хромогенного субстрата с добавлением в их состав антибиотика (новобицина). Присутствие сальмонеллы в образце определяется комбинацией различных тест-принципов:

а) изменение цвета самой среды с голубовато-фиолетового на желтый за счет подщелачивания среды в результате ферментативной (декарбоксилазной) активности;

б) формирование зеленых колоний за счет ферментативного разложения хромогенного субстрата, присутствующего в среде (черные колонии формируют сальмонеллы, продуцирующие сероводород);

в) наличие характерной подвижности сальмонеллы (колонии располагаются в стороне от точки инокуляции).

Колонии сальмонеллы с данной среды можно брать для дальнейшего исследования, т. е. пересева на питательные среды, или биохимической

идентификации. Присутствие колиформ на данной среде может вызвать изменение цвета среды с фиолетового на красно-пурпурный. Бактерии родов *Pseudomonas* и *Proteus* также могут изменить цвет среды на желтый, однако эти микроорганизмы в отличие от сальмонелл обладают меньшей подвижностью.

12. Среды для оптимизированного выявления и количественного определения *V. parahemolyticus* содержат хромогенный субстрат X-β-D, благодаря чему бактерии *V. parahemolyticus* формируют на данной среде голубые или зелено-голубые колонии, в то время как другие бактерии рода *Vibrio* формируют белые и бесцветные колонии. Рост другой бактериальной биоты ингибируется за счет присутствия в среде антибиотика ванкомицина.

13. Среды для оптимизированного выявления и количественного определения *S. aureus*. На данной среде *S. aureus* формирует желтые колонии с мутным ореолом. Желтый цвет колоний обуславливается сбраживанием бактериями маннитола с последующим выделением кислоты, которая взаимодействует с красителем, содержащимся в среде. Ореол помутнения формируется за счет взаимодействия липазы с лецитином яичного желтка, входящего в состав среды. Другие стафилококки растут на среде, но ореол не образуют.

14. Среды для оптимизированного выявления и количественного подсчета дрожжей и плесневых грибов (*Yeasts & Moulds*) содержат дрожжевой и картофельный экстракт, глюкозу, хромогенный субстрат X-Phos и хлорамфеникол, который ингибирует рост сопутствующей бактериальной флоры на среде. Дрожжи формируют на данной среде голубые колонии, грибы — пушистые колонии с характерной окраской.

ГЛАВА 5 ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1. Отбор проб пищевой продукции и продовольственного сырья проводят по ГОСТ 26668 или в соответствии с требованиями других действующих технических нормативных правовых актов (далее — ТНПА) на конкретные виды анализируемых образцов.

2. Отбор проб косметической продукции и сырья для ее изготовления проводят по СанПиН «Гигиенические требования к безопасности парфюмерно-косметической продукции, ее производству и реализации» или в соответствии с требованиями других действующих ГОСТ и ТНПА на конкретные виды анализируемых образцов.

2.1. Пробы сырья и косметической продукции для микробиологического анализа отбирают до отбора проб для физико-химических, органолептических и других видов испытаний с соблюдением правил асептики, чтобы исключить вторичное загрязнение продукта.

2.2. При испытаниях на стерильность от каждой партии косметических изделий независимо от ее объема, отбирают 10 ампул.

2.3. Пробу, отобранную от отдельной единицы упаковки косметической продукции, называют разовой. Количество продукта в разовых пробах из каждой единичной упаковки должно быть одинаковым. Разовые пробы соединяют,

перемешивают и составляют среднюю пробу.

3. Подготовку проб продовольственного сырья и пищевых продуктов проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 26669 и другими действующими ТНПА на конкретные виды анализируемых образцов.

3.1. Масса (объем) навески продукта, предназначенной для приготовления исходного разведения или гомогената, должна составлять не менее $10,0 \pm 0,1$ г/см³.

3.1.1. Исходные разведения пищевых продуктов и продовольственного сырья готовят с использованием физиологического раствора.

3.1.2. Соотношение между количеством (массой) высеваемого образца или его эквивалентным разведением и питательной средой — 1:9 по объему.

3.2. Жидкие образцы можно не разводить. Твердые продукты гомогенизируют.

3.3. Для обеспечения оптимального роста микроорганизмов величина рН исследуемого образца продукта или его разведения должны быть в интервале значений 6,6–7,2. Для кислых продуктов величину рН регулируют 1-нормальным (далее — 1 н) раствором КОН. Для щелочных продуктов величину рН регулируют 1 н раствором HCl.

3.4. Подготовку проб косметической продукции и сырья для ее изготовления проводят в соответствии с требованиями СанПиН «Гигиенические требования к безопасности парфюмерно-косметической продукции, ее производству и реализации».

3.4.1. Для подготовки к анализу следует использовать образцы испытуемых косметических изделий с ненарушенной упаковкой и не подвергавшихся внешнему воздействию.

3.4.2. Перед вскрытием упаковки место соединения крышки с тарой обрабатывают 70%-м раствором этилового спирта. Первую порцию в количестве примерно 10% содержимого упаковки отбрасывают, затем отбирают пробы и переносят в стерильную колбу или флакон вместимостью (100–200) см³.

3.4.3. Для испытания готовят среднюю пробу не менее 10 г (см³). При получении неудовлетворительных результатов анализа хотя бы по одному из микробиологических показателей проводят повторный анализ удвоенного объема выборки.

3.4.4. В случае, если масса (объем) косметического средства в единичной упаковке менее 10 г (см³), содержимое исследуют полностью или используют большее количество упаковок.

3.4.5. Среднюю пробу, массой ($10,0 \pm 0,1$) г (см³), отбирают с соблюдением правил асептики и помещают в стеклянные колбы или флаконы, содержащие (90 ± 1) см³ 1%-го раствора твина-80 в физиологическом растворе (1,0 г твина-80 растворяют в 99 см³ физиологического раствора, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при температуре $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин; хранят при комнатной температуре не более 14 сут). Смесь тщательно перемешивают до полной гомогенизации. При необходимости пробы нагревают на водяной бане или в термостате до $(40–45)^\circ\text{C}$, но не более 10 мин. Для гомогенизации продукции, плохо растворимой в воде, используют стеклянные бусы.

3.4.6. Эмульсии типа вода–масло готовят аналогичным способом, используя 4%-й раствор твина-80 в физиологическом растворе (4,0 г твина-80 растворяют в 96 см³ физиологического раствора, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при температуре (121±1)°С в течение 15 мин; хранят при комнатной температуре не более 14 сут), предварительно (до встряхивания) прогревая на водяной бане или в термостате до (40–45)°С в течение 20 мин.

3.4.7. Полученная смесь содержит 1 г (см³) косметического средства в 10 см³, т. е. первое разведение 1:10 (10⁻¹). Материал из первого разведения (1 см³) переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физраствора, перемешивают новой стерильной пипеткой и получают второе разведение 1:100 (10⁻²). Из второго разведения 1 см³ переносят в следующую пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора, перемешивают новой стерильной пипеткой и получают третье разведение 1:1000 (10⁻³) и т. д. В результате исследуемая продукция оказывается разведенной в 100 (10⁻²), 1000 (10⁻³) и более раз. Полученные разведения используют для посевов.

3.5. Жидкие формы косметической продукции можно не разводить.

3.6. Анализ подготовленных образцов косметической продукции должен быть выполнен в течение 30 мин. При невозможности выполнения этого условия анализ допускается проводить не позже чем через 3 ч после подготовки проб, сохраняя их в холодильнике при (+4–10)°С.

ГЛАВА 6 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Проведение испытаний для подсчета количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, количества дрожжей и плесневых грибов, энтеробактерий, колиформных бактерий, сальмонелл, бактерий вида *E. coli*, *S. aureus*, *V. parahemolyticus*.

1.1. Исследование продуктов.

1.1.1. Пластиковую чашку с сухой средой помещают на ровную поверхность. Из подготовленного образца продукта или его соответствующего разведения, смывной жидкости отбирают образец объемом 1,0 см³. Снимают крышку и кладут рядом. Вносят 1,0 см³ исследуемого образца или разведения в центр чашки. Закрывают чашку крышкой и помещают в термостат.

1.1.2. Для выявления малых количеств сальмонелл (1 КОЕ/25 г) проводят предварительное обогащение образца по ГОСТ 30519.

1.1.2.1. Неселективное обогащение образца.

1.1.2.1.1. Твердые образцы измельчают в гомогенизаторе. Навеску анализируемого образца 25,0 г или 25,0 см³ вносят в 225 см³ забуференной пептонной воды.

1.1.2.1.2. Полученные смывы образцов инкубируют в течение 18–20 ч при температуре 37°С.

1.1.2.2. Селективное обогащение образца.

1.1.2.2.1. Смывы образцов, полученные после инкубирования в соответствии с разделом 1.1.2.1 инструкции, пересевают в две среды для селективного обогащения.

Для этого по $10,0 \text{ см}^3$ посевов переносят в магниевую среду или среду Раппопорт–Василиадис и в тетрационатную среду в соотношении 1:9.

1.1.2.2.2. Посевы инкубируют с магниевой средой или средой Раппопорт–Василиадис в течение 24 ч при температуре 37°C , с тетрационатной средой — в течение 24 ч при температуре $43\pm 1^\circ\text{C}$.

1.1.3. Выявление бактерий рода *Salmonella* после селективного обогащения образца.

1.1.3.1. Чашки с сухой средой для выявления в исследуемом образце бактерий рода *Salmonella* помещают на ровную поверхность. Снимают крышку с чашки и кладут рядом. Вносят по $1,0 \text{ см}^3$ посевов, полученных в соответствии с разделом 1.1.2.2.2 инструкции в центр чашки, закрывают чашку крышкой и помещают в термостат.

1.2. Метод мембранной фильтрации.

1.2.1. При использовании метода мембранной фильтрации (диаметр фильтра не должен превышать диаметр чашки) на среду предварительно вносят $0,8 \text{ см}^3$ стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl) и оставляют на 10–20 мин для впитывания. В течение этого времени образец пропускают через мембранный фильтр, который затем извлекают из фильтродержателя, помещают на чашку тыльной стороной вверх и закрывают чашку крышкой.

1.2.2. Чашка со средой инкубируется вместе с фильтром. После инкубирования фильтр снимается и подсчитываются выросшие на среде колонии.

2. Тестирование поверхностей (смывы).

2.1. При исследовании поверхностей с помощью тампонов после протирки переносят тампон в пробирку с 10 см^3 стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl) и встряхивают пробирку (это соответствует разведению 1:10, которое необходимо учитывать при оценке результатов). Раствор, объемом 1 см^3 , вносят на чашку.

3. Исследование воздуха.

3.1. При исследовании воздуха методом экспонирования снимают крышку с чашки. Открытую пластиковую чашку экспонируют в зоне обследования в течение 30 мин. Затем на поверхность чашки вносят 1 см^3 стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl).

3.2. При исследовании проб воздуха может использоваться вспомогательное специальное оборудование.

4. Процесс инкубации.

4.1. В термостате чашки располагают в горизонтальном положении крышкой вверх. Допускается размещать чашки друг на друге (до 30 штук).

4.2. При определении и подсчете количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов инкубация сред *Total counts* производится в течение 48 ч при температуре $35\pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.1. Среды для выявления и количественного подсчета мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов можно также инкубировать в течение 48 ± 3 ч при температуре $30\pm 1^\circ\text{C}$ для того, чтобы учесть количество дрожжевых и плесневых грибов. Данный способ инкубации рекомендуется использовать при исследовании проб воды, воздуха.

4.3. При определении и подсчете количества дрожжей и плесневых грибов инкубация сред *Yeasts&Moulds* производится в течение 3–7 дней при температуре 25–30°C.

4.4. При определении и подсчете количества энтеробактерий инкубация сред *Enterobacteriaceae* производится в течение 24±3 ч при температуре 36±1°C.

4.5. Как при раздельном, так и при одновременном определении и подсчете количества колиформных бактерий и бактерий рода *E. coli* инкубация сред *Coliforms* и *E. coli/Coliforms* производится в течение 24±3 ч при температуре 36±1°C.

4.6. При определении и подсчете количества сальмонелл инкубация сред *Salmonella* осуществляется в течение 22±2 ч при температуре 42±1°C. Выросшие колонии можно изолировать для дальнейшей идентификации по ГОСТ 30519. Для этого необходимо поднять крышку, сетчатую основу и извлечь колонию из геля.

4.7. При определении и подсчете количества бактерий *S. aureus* инкубация сред производится при температуре 36±1°C в течение 48 ч.

4.8. При определении и подсчете количества бактерий рода *V. parahaemolyticus* инкубация сред производится в течение 18–24 ч при температуре 36±1°C.

4.9. При отрицательном результате возможна дальнейшая инкубация всех видов сухих сред *Compact Dry*TM дополнительно в течение 24 ч для исключения ложно отрицательного результата. Это обязательно в том случае, если предполагается, что микроорганизмы были повреждены или неактивны в процессе обработки продуктов (например, консервы, которые были стерилизованы при температуре выше 120°C и т. д.).

5. Обработка результатов.

5.1. После инкубации чашек *Compact Dry*TM Total counts подсчитывают красные колонии, независимо от их размера и интенсивности окраски.

5.1.1. Если инкубированные среды с разведением образца 1:10 не содержат колоний, то результат выражают следующим образом: менее 1×10^1 или менее 10 бактерий на 1,0 см³ (г) продукта.

5.1.2. Если на средах с разведением образца 1:10 содержится меньше 30 колоний, то результат выражают следующим образом: количество микроорганизмов менее $M \times 10$, где M — число выросших колоний.

5.1.3. Если количество колоний более 30, подсчитывают их количество, умножают на соответствующее разведение и получают число микроорганизмов в 1,0 см³ (г) продукта.

5.1.4. На средах, где выросло более 300 колоний, подсчитывают количество колоний в одном или более показательных квадратах (обратная сторона чашки имеет разметку в виде клеток 1×1 см), определяют среднее количество колоний на квадрат. Умножают среднее число колоний на 20, т. к. зона роста чашки со средой имеет площадь 20 см², и на соответствующее разведение получают число микроорганизмов в 1,0 см³ (г) продукта.

5.1.5. Полученный результат округляют по СТБ ISO 7218 и ГОСТ 26670. Ответ выражают в виде числа КОЕ/г (см³).

5.2. После термостатирования сухих сред *Yeasts&Moulds* в течение 72 ч подсчитывают количество дрожжей и плесневых грибов суммарно.

5.2.1. При необходимости для разделения колоний дрожжей и плесневых грибов увеличивают время инкубации, проводят микроскопические исследования. После 72 ч инкубации колонии дрожжей на средах голубые либо синие, круглой либо овальной формы с четким краем. Колонии плесневых грибов опушенные, более диффузные, чем колонии дрожжей, большего размера, голубые, красно-фиолетовые, синие либо голубые с красно-фиолетовым центром. Для выполнения микроскопического исследования поднимают крышку, сетчатую основу и вынимают колонию из геля. Из колонии готовят препарат методом раздавленной капли.

5.2.2. Результаты микроскопирования оценивают, пользуясь характеристикой дрожжей и плесневых грибов.

5.2.3. Для количественного подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 колоний дрожжей и от 5 до 50 колоний плесневых грибов, умножают на соответствующее разведение и получают число дрожжей или плесневых грибов в $1,0 \text{ см}^3$ (г) продукта.

5.2.4. На чашках со средой, где выросло более 150 колоний дрожжей и более 50 колоний плесневых грибов, подсчитывают количество колоний в одном или более показательных квадратах и определяют среднее количество колоний на квадрат. Умножают среднее число колоний на 20, т. к. зона роста пластиковых чашек имеет площадь 20 см^2 , и на соответствующее разведение получают число микроорганизмов в $1,0 \text{ см}^3$ (г) продукта.

5.2.5. Результаты обрабатывают и пересчитывают отдельно для дрожжей и плесневых грибов.

5.3. После инкубации сред *Coliforms* учитывают колонии, окрашенные в голубой либо зелено-голубой цвет (колиформные бактерии).

5.4. После термостатирования сред *E. coli/Coliforms* учитывают красные и голубые колонии. При подсчете вместе они составляют общее количество колоний группы колиформ (*E. coli* 0157 формирует розовые либо красные колонии).

5.5. После инкубации сред *Enterobacteriaceae* учитывают колонии красного или пурпурного (бордового) цвета.

5.6. После термостатирования сред *Salmonella* учитывают колонии зеленого или черного (сальмонеллы, продуцирующие сероводород) цвета. Принадлежность колоний к роду *Salmonella* должна быть подтверждена серологическими либо биохимическими методами.

5.7. После инкубации чашек со средой для определения *S. aureus* учитывают желтые колонии с мутным ореолом.

5.8. После термостатирования сред для определения *V. parahemolyticus* учитывают колонии, окрашенные в голубой или зелено-голубой цвет. Бесцветные или белые колонии не учитывают.

5.9. При необходимости колонии, выросшие на сухих средах для определения энтеробактерий, колиформных бактерий, сальмонелл, бактерий вида *E. coli*, *S. aureus*, *V. parahemolyticus*, можно изолировать для дальнейшей идентификации.

ГЛАВА 7 СПОСОБ УТИЛИЗАЦИИ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЧАШЕК СО СРЕДОЙ

Утилизация использованных чашек производится путем стерилизации в автоклаве при 131°C в течение 10 мин или кипячением в течение 15 мин.

ГЛАВА 8 КОНТРОЛЬ ТОЧНОСТИ ПОЛУЧАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ

1. Контроль точности получаемых результатов измерений осуществляется с целью получения информации о качестве исследований и принятия оперативных мер, предупреждающих ухудшение точности результатов. В процессе внутреннего оперативного контроля определяются показатели повторяемости и точности.

2. Средства контроля точности получаемых результатов измерений.

2.1. В качестве средств в процессе контроля точности получаемых результатов измерений применяются рабочие образцы (для определения показателей повторяемости).

2.2. Результаты контроля точности фиксируются в соответствии с установленной системой регистрации контроля правильности выполнения измерений.

2.3. Результаты контроля повторяемости выполняются для каждого анализа и фиксируются в рабочих журналах исполнителей.

3. Порядок проведения контроля повторяемости.

3.1. Контроль повторяемости результатов измерений проводится при получении каждого результата измерения, предусматривающего параллельные определения.

3.2. Контроль повторяемости заключается в сравнении расхождений результатов параллельных определений, полученных при анализе рабочей пробы, с пределом повторяемости r , который рассчитывается по нижеследующей формуле:

$$r = Q_{(p,n)} \cdot Sr, \quad (1)$$

где $Q_{(p,n)}$ — коэффициент, определяемый по статистическим таблицам, исходя из заданной доверительной вероятности p и числа параллельных определений при анализе рабочей пробы в соответствии с методикой; для $n = 2$ и $p = 0,95$ $Q_{(p,n)} = 2,7$;

Sr — среднее квадратичное отклонение результата единичного измерения.

Разность между наибольшим и наименьшим результатом параллельных измерений сравнивается с пределом повторяемости r .

3.3. Результаты параллельных измерений считаются приемлемыми, если выполняется условие, выраженное формулой:

$$|X_{max} - X_{min}|, \quad (2)$$

где $X_{i\ max}$ — максимальный результат из n параллельных измерений;
 $X_{i\ min}$ — минимальный результат из n параллельных измерений.

ГЛАВА 9 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ

1. Результаты испытаний оформляются по форме, установленной действующей в лаборатории системой регистрации данных. Результаты должны включать следующую информацию:

- наименование (шифр) пробы;
- дату проведения измерений;
- результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;
- результаты параллельных определений;
- окончательный результат измерений;
- значение приписанной или рассчитанной погрешности измерения или ее составляющих;
- фамилию оператора.

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

СанПиН 9-80 РБ 98	Санитарные правила и нормы «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений»
СП 17-129-99	Санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами»
СанПиН от 13.08.2008 № 130-А	Санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы «Гигиенические требования к безопасности парфюмерно-косметической продукции, ее производству и реализации»
Постановление Министерства здравоохранения 09.06.2009 № 63 СТБ 1499-2004	Санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия
СТБ ISO 7218-2010	Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования к выполнению микробиологических исследований
ГОСТ 12.1.005-88	Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 1770-74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 2884-78	Микроскоп световой биологический. Технические условия
ГОСТ 4233-77	Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
ГОСТ 5556-81	Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия
ГОСТ 6672-75	Стеклянные покровные для микропрепаратов. Технические условия
ГОСТ 9284-75	Стеклянные предметные для микропрепаратов. Технические условия
ГОСТ 14919-83	Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия
ГОСТ 19569-89	Стерилизаторы паровые медицинские. Общие технические требования и методы испытаний
ГОСТ 23932-90	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия
ГОСТ 24104-2001	Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 24437-89	Стерилизатор сухожаровой. Технические условия
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 25706-83	Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования
ГОСТ 26668-85	Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов
ГОСТ 26669-85	Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов
ГОСТ 26670-91	Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов
ГОСТ 27437-87	Стерилизаторы медицинские паровые и воздушные. Правила обслуживания
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
ГОСТ 30519-97	Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода <i>Salmonella</i>
ТУ РБ 100644799.002-2001	Хладотермостат воздушный ХТ 3/70-1
ТУ 9444-011-03965956-2004	Облучатель бактерицидный подвесной ОБП-300 УХЛ4 «Азов»
ТУ 9452-002-00141798-97	Термостат суховоздушный ТС-2М