

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный
санитарный врач

_____ В.И. Качан
19 марта 2010г.
Регистрационный № 078-0210

**САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ
НА ОБЪЕКТАХ ОБЩЕСТВЕННОГО ПИТАНИЯ
И ПРЕДПРИЯТИЯХ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ ТОРГОВЛИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси Л.П. Титов, канд. биол. наук Т.С. Ермакова, канд. биол. наук Е.Ф. Панышина

Минск 2010

РАЗДЕЛ I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Глава 1. Область применения

1. Настоящая Инструкция по применению предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор за объектами общественного питания и предприятиями продовольственной торговли, и устанавливает методы микробиологических исследований, обеспечивающие выпуск и реализацию доброкачественных и безопасных в эпидемическом отношении пищевых продуктов, и тем самым предупреждение пищевых отравлений бактериальной природы и острых кишечных инфекций. Цель санитарно-бактериологического контроля: выявить возможные причины выпуска на производстве или реализации в торговой сети продуктов, недоброкачественных или опасных в эпидемическом отношении, и способствовать ликвидации этих причин.

2. В настоящей Инструкции по применению представлены методы санитарно-бактериологического контроля объектов общественного питания и предприятий продовольственной торговли, рецептура применяемых сред, позволяющие получать сравнимые достоверные данные, характеризующие санитарное благополучие отдельного участка, предприятия в целом или ряда предприятий. 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 санитарном неблагополучии.

Глава 2. Объекты и методы санитарно-бактериологического контроля

1. При санитарно-бактериологическом исследовании смывов ограничиваются выявлением бактерий группы кишечных палочек (далее — БГКП), обнаружение их расценивают как одно из подтверждений нарушения санитарного режима.

2. При необходимости более тщательного исследования (например, по эпидемическим показаниям) определяют общую бактериальную обсемененность и наличие *Staphylococcus aureus*.

3. Объемы и конкретные объекты санитарно-бактериологических исследований определяют органы и учреждения, осуществляющие государственный санитарный надзор, в зависимости от эпидемической обстановки на контролируемой ими территории.

4. Санитарно-бактериологические исследования проводятся:

- при обследовании объектов общественного питания и предприятий продовольственной торговли (далее — предприятий), осуществляемых в порядке текущего санитарного надзора;
- при обследовании предприятий в порядке предупредительного санитарного надзора с целью гигиенической оценки технологической линии производства новых блюд; новых типов технологического и торгового оборудования, а также при вводе в эксплуатацию новых или реконструированных предприятий;
- при санитарных обследованиях предприятий в арбитражном

порядке, по санитарно-эпидемическим показаниям, а также по заданиям вышестоящих организаций.

5. Объекты санитарно-бактериологического обследования:

- оборудование, инвентарь, посуда, тара для пищевых продуктов и др. с целью проверки эффективности санитарной обработки;
- смывы с рук и санитарной одежды (с целью проверки соблюдения личной гигиены персоналом);
- вода центрального водоснабжения и особенно — местных источников (места водозабора, краны).

6. Санитарно-бактериологический контроль пищевых продуктов и сырья для их производства осуществляется по действующим техническим нормативных правовым актам (далее — ТНПА) на конкретный вид продуктов и сырья и не устанавливается настоящей Инструкцией.

7. Санитарное обследование с отбором проб для лабораторных исследований проводится помощником врача-гигиениста или врача-эпидемиолога в присутствии руководителя предприятия или заменяющего его лица без предварительного оповещения. Каждое обследование оформляется актом в 3-х экземплярах по установленной форме, который подписывается лицом, производящим обследование, и руководителем предприятия.

РАЗДЕЛ II. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 3. Отбор и исследование смывов

1. В практике государственного санитарного надзора за предприятиями с целью контроля эффективности санитарной обработки инвентаря, оборудования, посуды, тары для пищевых продуктов, санитарной одежды и рук персонала используется метод смывов.

2. Отбор смывов должен производиться помощником врача-гигиениста или врача-эпидемиолога, в необходимых случаях совместно с работниками лаборатории.

3. Непосредственно на предприятии при каждом обследовании устанавливают конкретные точки для взятия смывов. При повторных обследованиях берут 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;
- при взятии смывов с рук записывается: номер по порядку, фамилия, имя, отчество сотрудника, выполняемая работа (профессия и участок работы);
- составляется направление на исследование в лабораторию, подписывается лицом, отобравшим смывы, в присутствии представителя предприятия.

4. Взятие смывов производится с помощью увлажненных стерильных ватных тампонов на металлических стержнях, на стеклянных, деревянных,

пластмассовых палочках или марлевых салфеток (5×5 см), которые заготавливаются заранее в лаборатории. Могут использоваться коммерческие тампоны.

5. В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном наливается по 5 см³ стерильной 0,1%-й пептонной воды или стерильного физиологического раствора, при этом тампон остается над жидкостью, не касаясь ее. Перед взятием смыва тампон погружают в жидкость. В процессе отбора смывов рекомендуется неоднократное смачивание тампона для обеспечения более полноценного смыва бактерий с объекта. При целенаправленном исследовании смывов объектов на БГКП или *S.aureus* допускается погружение тампонов непосредственно в селективную питательную среду (среда Кесслера, солевой бульон или др.), разлитую в пробирки также по 5,0 см³:

- из оборудования следует прежде всего контролировать разделочные доски, мясорубки, производственные столы для готовой пищи, особенно в цехе приготовления холодных закусок;

- смывы с рук, санитарной одежды берут в основном у работников, имеющих дело с продукцией, не подвергаемой в дальнейшем тепловой обработке (персонал кухни, холодного цеха, раздатчицы, буфетчицы, официанты, продавцы);

- смывы с крупного оборудования и инвентаря берут с поверхности 100 см² с помощью шаблона (трафарета), сделанного из проволоки площадью 25 см². Смоченным ватным тампоном или марлевой салфеткой обтирают поверхность, ограниченную шаблоном, во взаимно перпендикулярных направлениях. Чтобы взять смывы с площади 100 см², трафарет накладывают 4 раза в разных местах поверхности контролируемого объекта. При взятии смывов с мелкого инвентаря обтирают всю внутреннюю поверхность предмета;

- 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;

- при исследовании стаканов протирают внутреннюю поверхность и верхний наружный край стакана на 2 см вниз;

- при взятии смывов с рук увлажненным стерильной жидкостью тампоном протирают ладонные поверхности обеих рук сначала вдоль, потом поперек, затем межпальцевые пространства, ногти и подногтевые пространства;

- при взятии смывов с санитарной одежды протирают 4 площадки по 25 см² — нижнюю часть каждого рукава и 2 площадки с верхней и средней частей передних пол санитарной одежды. С различных мест полотенца берут 4 площадки по 25 см².

6. После взятия смыва тампон вновь погружают в пробирку со стерильной жидкостью, встряхивают и дают отстояться 2–3 мин. Полученный материал в лаборатории помещают в 5 см³ среды Кесслера.

Дальнейший анализ проводят согласно пп. 2–4 гл. 4 настоящей Инструкции.

7. Доставка смывов должна производиться в термоконтейнерах с охлаждаемыми вкладышами. Время доставки смывов в лабораторию для осуществления исследования не должно превышать 2 ч.

Глава 4. Методы микробиологических исследований

1. При текущем санитарном надзоре исследование смывов проводят на присутствие бактерий группы кишечных палочек (далее — БГКП):

- исследование смывов на наличие *Staphylococcus aureus* проводят при обследовании кремово-кондитерских цехов столовых и ресторанов, молочных кухонь и других пищеблоков, обращая особое внимание на контроль рук персонала;

- общую микробную обсемененность определяют для установления эффективности санитарной обработки посуды в посудомоечных машинах, при оценке новых моющих и дезинфицирующих средств;

- при повторном обнаружении БГКП в значительном проценте смывов на объекте рекомендуется провести исследование смывов с инвентаря, оборудования и рук персонала на наличие энтеробактерий согласно Инструкции 4.2.10-15-21-2006 «Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь № 120 от 09.10.06.

2. Определение БГКП (колиформных бактерий) основано на их способности сбраживать в среде Кесслера лактозу с образованием кислоты и газа. БГКП — это аэробные и факультативно-анаэробные грамотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 36 ± 1 °С в течение 24 ч (бродильная проба), не обладающие оксидазной активностью:

- для определения БГКП в смывах с оборудования и рук в пробирки, содержащие 5 см³ среды Кесслера или КОДА, опускают тампоны со смывом и туда же переносят оставшуюся смывную жидкость. Посевы инкубируют при температуре 36 ± 1 °С. Через 18–24 ч из пробирок со средой Кесслер, в которых обнаружено газообразование, проводят пересев петлей на среду Эндо и инкубируют при температуре 36 ± 1 °С в течение 24 ч. Со среды КОДА высеивают только в случае изменения окраски среды или ее помутнения;

- при наличии на среде Эндо колоний (красных с металлическим блеском и без него или розовых), характерных для БГКП, из изолированных колоний готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных без спор палочек делают заключение о присутствии БГКП. При обнаружении грамотрицательных, не образующих спор палочек, выполняют оксидазный тест. Для этого колонии со среды Эндо наносят штрихом на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную реактивом для определения цитохромоксидазы. В месте нанесения бактериальной массы бумага не изменяет цвета, если оксидазный тест

отрицательный, и синеет в течение 1 мин, если бактерии имеют оксидазу. При обнаружении грамотрицательных не образующих спор палочек и отрицательном тесте на оксидазу делают заключение о присутствии БГКП в смывах.

3. Определение общей микробной обсемененности основано на подсчете колоний, видимых при увеличении в 2 раза, выросших на питательных средах при инкубации посевов при 30 °С в течение 72 ч:

- в пробирку с тампоном добавляют 5 см³ 0,1%-й пептонной воды или изотонического раствора хлорида натрия. Тампон тщательно отмывают, после чего по 1 см³ смывной жидкости вносят в две параллельные чашки Петри, заливают расплавленным и остуженным до 45 °С мясопептонным агаром (далее — МПА) (15–20 см³), размешивают. После застывания агара чашки переворачивают и помещают в термостат при температуре 30 °С на 72 ч. Предварительный учет колоний проводится через 48 ч, окончательный через 72 ч. Подсчитывают среднее арифметическое количество колоний, выросших на двух чашках, и умножают на 10 для определения количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета;

- если при посевах оказалось, что на засеянных чашках выросло менее 15 колоний, в результатах анализа рекомендуется написать: «Рост единичных колоний при посеве (указать количество засеянной смывной жидкости)». При отсутствии роста колоний результаты выражают таким образом: «Не обнаружено микроорганизмов в 1 см³ смывов». Если на чашках, более чем на 1/2 их площади, имеется рост спорообразующих микроорганизмов или за счет спорных микроорганизмов подсчет изолированных колоний невозможен, в результате анализа следует написать: «Рост спорообразующих микроорганизмов». Результаты выражают в колониеобразующих единицах — КОЕ (на 1 см³ смывов).

4. Определение *Staphylococcus aureus* основано на выявлении характерного роста бактерий на селективных средах, изучении морфологических свойств, постановке теста плазмокоагуляции, ферментации маннита. Тампон помещают в пробирку с 6–7 см³ солевого мясопептонного бульона (содержание хлорида натрия 6,5%). Пробирку инкубируют в термостате при температуре 36±1 °С 18–24 ч. Из солевого бульона производят высеивание на селективные среды: желточно- или молочно-солевой агар, маннитол-агар и др. Посевы инкубируют при температуре 36±1 °С 48 ч:

- подозрительные на патогенные стафилококки колонии (непрозрачные, золотистые, кремовые, эмалевые, лимонно-желтые имеют форму правильных дисков от 2 до 4 мм в диаметре, слегка выпуклые на молочно- и желточно-солевом агаре с радужным венчиком вокруг колоний). Готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют, отсеивают на скошенный мясопептонный агар (далее — МПА) и инкубируют при температуре 37 °С 18–24 ч. Число колоний, взятых для идентификации, должно быть не менее пяти или все выросшие колонии. Стафилококки положительно окрашиваются по Граму, имеют шарообразную форму с диаметром 0,6–1 мк и располагаются часто в виде скоплений, напоминающих

гроздья винограда. Односуточную культуру проверяют на принадлежность к роду стафилококка и подтверждают вид *S.aureus* в реакции плазмокоагуляции и тесте ферментации маннита в анаэробных условиях;

- постановка реакции плазмокоагуляции: в пробирку с 0,5 см³ плазмы (лучше кроличьей), разведенной изотоническим раствором хлорида натрия в пропорции 1:5 (1 см³ плазмы + 4 см³ раствора), вносят петлю суточной культуры стафилококка. Для контроля одну пробирку с плазмой оставляют незасеянной, а в другую засевают суточную культуру *S. aureus*. Пробирки помещают в термостат при температуре 36±1 °С на 24 ч. При положительной реакции плазмокоагуляции (сгусток образовался в течение 24 ч) делают заключение о присутствии патогенного стафилококка.

Глава 5. Питательные среды и реактивы

1. Питательные среды готовят в эмалированной или стеклянной посуде. Их растворяют при перемешивании в дистиллированной воде комнатной температуры до полного растворения не менее 15 мин и затем при необходимости нагревают, если нет специальных указаний.

2. Необходимое значение рН питательных сред устанавливают в растворах комнатной температуры с помощью растворов гидроксида натрия с массовой концентрацией 10 г/дм³, лимонной кислоты — 20 г/дм³ или раствора соляной кислоты объемной концентрацией 25 см³/дм³, прибавляя при перемешивании по каплям реактив к среде и определяя значение рН в периодически отбираемой пробе потенциометрически или с помощью индикатора. При подщелачивании среды щелочью значение рН после кипячения и стерилизации снижается, примерно на 0,2. Поэтому при приготовлении сред устанавливают рН на 0,2–0,4 выше заданного, кипятят, пока рН не понизится на 0,2–0,3, снова проверяют рН и стерилизуют в автоклаве. Обязательно проверяют рН после стерилизации.

3. Готовые питательные среды хранят при комнатной температуре не более 3 сут и при температуре около 4 °С не более 1 мес., если нет специальных указаний.

4. Растворы (жидкости) для приготовления разведений:

- пептонная вода 0,1%-я:

1 г пептона растворяют при нагревании в 1 дм³ дистиллированной воды, фильтруют, устанавливают рН 7,0±0,1. Стерилизуют при температуре 121±1 °С в течение 20 мин;

- физиологический раствор:

8,5 г хлорида натрия растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды, фильтруют. Стерилизуют при температуре 121±1 °С в течение 20 мин.

5. Среда для определения БГКП:

- среда Кесслера:

к 1 дм³ дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 50 см³ бычьей желчи. Смесь кипятят на водяной бане 20-30 мин при помешивании, фильтруют через вату, добавляют 2,5 г лактозы, доводят объем дистиллированной воды до 1 дм³, устанавливают рН 7,4–7,6, добавляют 2 см³ 1%-го водного раствора генцианвиолета, разливают в пробирки с поплавками

по 8–10 см и стерилизуют при температуре 121 ± 1 °С в течение 10 мин. Готовая среда имеет темно-фиолетовый цвет;

- среда Кесслера с лактозой, среда КОДА, среда Эндо, МПА, мясопептонный бульон (далее — МПБ) из сухого препарата: способ приготовления приводится на этикетке.

6. Среда для определения общего количества микроорганизмов

сухой питательный агар 35,0 г

сухой экстракт кормовых дрожжей 2,5 г

глюкоза 1,0 г

вода дистиллированная 1 дм³

Готовят среду, устанавливают рН 7,0, фильтруют. Разливают в пробирки по 15 см³. Стерилизуют при 121 ± 1 °С в течение 20 мин.

7. Среды для определения *Staphylococcus aureus*:

- солевой бульон:

в 1 дм³ МПБ растворяют 65 г хлорида натрия, фильтруют, устанавливают рН 7,0–7,2. Стерилизуют при температуре 121 ± 1 °С в течение 20 мин. Количество хлорида натрия можно увеличить до 90 г;

- желточно-солевой агар по Чистовичу:

к 1 дм³ стерильного расплавленного и охлажденного до 45–60 °С МПА, содержащего 100 г хлорида натрия (рН 7,2), асептически добавляют 200 см³ желточной эмульсии. Перемешивают, разливают в чашки Петри;

- желточная эмульсия: поверхность яйца протирают 96%-м этиловым спиртом, асептически извлекают желток и смешивают его, добавляя по 20–30 см³, с 200 см³ стерильного физиологического раствора;

- молочно-солевой агар:

к 1 дм³ расплавленного и охлажденного до 45–60 °С МПА, содержащего 65 г хлорида натрия (рН 7,2–7,4), добавляют асептически 100 см³ стерильного обезжиренного молока. Перемешивают, разливают в чашки Петри;

- молоко обезжиренное: молоко доводят до кипения, оставляют на сутки в холодильнике, освобождают от сливок, вторично доводят до кипения. Вновь оставляют на 1 сут в холодильнике и снимают верхний слой. Разливают во флаконы и стерилизуют при температуре 116 ± 1 °С в течение 20 мин. Молоко не должно иметь коричневого оттенка;

- агар солевой (из сухого препарата):

к сухому препарату солевого агара согласно прописи на этикетке добавляют желточную эмульсию для получения желточно-солевого агара или молоко обезжиренное для получения молочно-солевого агара;

- маннитол-агар (из сухого препарата): способ приготовления приводится на этикетке. Среду разливают в пробирки по 12–15 мл;

- цитратная плазма кролика для реакции плазмокоагуляции: препарат выпускается в сухом виде. Готовят непосредственно перед употреблением согласно прописи в прилагаемом наставлении.

8. Реактив для определения цитохромоксидазы бактерий: 30–40 мг α-

нафтола растворяют в 2,5 см³ ректифицированного этилового спирта, прибавляют 7,5 см³ дистиллированной воды и растворяют 40–60 мг диметил-п-фенилендиамина. Раствор готовят перед употреблением. Хранить раствор не более 7 дней при температуре 2–4 °С в закрытой банке.

9. Растворы и реактивы для окраски по Граму:

- карболовый раствор генцианвиолета:

генцианвиолет	1,0 г
спирт этиловый ректифицированный	10, см ³
фенол	5,0 г
дистиллированная вода	100 см ³
- раствор Люголя:

йод металлический	1,0 г
йодистый калий	2,0 г
дистиллированная вода	300 см ³
- фуксин Циля:

основной фуксин	1,0 г
спирт этиловый ректифицированный	10 см ³
фенол	5,0 г
дистиллированная вода	100 см ³

Для работы фуксин Циля развести дистиллированной водой (1:10).

10. Допускается использование других коммерческих питательных сред, реактивов и диагностических препаратов аналогичного назначения для исследований в соответствии с настоящей Инструкцией по применению, руководствуясь рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества International Standardization Organization (Международной организации стандартов) 9000 или European Norm (Европейские нормативы) 29000. Питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по ТНПА, утвержденным в порядке, установленном законодательством.

Глава 6. Аппаратура

Аппаратура:	ТНПА
Термостат для температурного режима 36±1 °С	ТУ 64-1-1382-72
Весы лабораторные общего назначения 2 и 4-го класса точности, с пределом взвешивания до 200 г, допустимая погрешность не более 0,02 г	ГОСТ 24104-88
Анализатор потенциометрический, обеспечивающий измерение рН с погрешностью до 0,01	ГОСТ 9245-79
Микроскоп биологический, обеспечивающий увеличение от 84х до 1350х	ГОСТ 8284-78
Стерилизаторы паровые медицинские	ГОСТ 19569-89
Холодильник бытовой	любой марки