



Про затвердження Державних санітарних правил і норм "Папір і картон на основі макулатури, призначені для пакування сухих харчових продуктів. Гігієнічні вимоги, критерії оцінки якості і безпечності, методи визначення"

**Наказ Міністерства охорони здоров'я України
від 13 листопада 2006 року N 746**

**Зареєстровано в Міністерстві юстиції України
5 грудня 2006 р. за N 1266/13140**

Відповідно до статті 40 Закону України "Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення" **НАКАЗУЮ:**

1. Затвердити Державні санітарні правила і норми "Папір і картон на основі макулатури, призначені для пакування сухих харчових продуктів. Гігієнічні вимоги, критерії оцінки якості і безпечності, методи визначення" (додаються).
2. Департаменту державного санітарно-епідеміологічного нагляду (Пономаренко А. М.):
 - 2.1. Забезпечити державну реєстрацію цього наказу в Міністерстві юстиції України.
 - 2.2. Довести цей наказ до відома керівників міністерств, центральних органів виконавчої влади, установ і закладів державної санітарно-епідеміологічної служби, наукових установ для використання в роботі під час здійснення державного санітарно-епідеміологічного нагляду.
3. Скасувати "Санітарні правила і норми "Папір і картон на основі макулатури, призначені для пакування сухих харчових продуктів. Гігієнічні вимоги, критерії оцінки якості, методи визначення", затверджені заступником головного державного санітарного лікаря України від 2 березня 1994 року за N 17/04-06/213.
4. Контроль за виконанням наказу покласти на директора Департаменту державного санітарно-епідеміологічного нагляду Пономаренка А. М.

**Перший заступник Міністра,
Головний державний
санітарний лікар України**

С. П. Бережнов

ЗАТВЕРДЖЕНО
наказом Міністерства охорони здоров'я
України
від 13 листопада 2006 р. N 746

Зареєстровано
в Міністерстві юстиції України
5 грудня 2006 р. за N 1266/13140

Державні санітарні правила і норми
"Папір і картон на основі макулатури, призначені для пакування сухих
харчових продуктів. Гігієнічні вимоги, критерії оцінки якості і безпечності,
методи визначення"

1. Загальні положення

1.1. Державні санітарні правила і норми "Папір і картон на основі макулатури, призначені для пакування сухих харчових продуктів. Гігієнічні вимоги, критерії оцінки якості і безпечності, методи визначення" (далі - ДСанПіН) містять обов'язкові для виконання підприємствами всіх форм власності санітарно-гігієнічні вимоги, критерії оцінки якості паперу і картону на основі макулатури, які призначені для пакування сухих харчових продуктів з вологістю не більше 15,0 %, та методи визначення санітарно-гігієнічних показників.

1.2. Для виготовлення паперу (картону) дозволяється використовувати волокнисті композиції, які містять первинне волокно (целюлозу різних видів, деревну масу) і вторинне волокно - макулатуру згідно з ДСТУ 3500-97 "Макулатура паперова і картонна. Технічні умови" (далі - ДСТУ 3500) марок МС-1А, МС-2А, МС-3А, МС-4А, МС-5Б, МС-6Б, МС-7Б, МС-8В, МС-9В, МС-10В, МС-13В різних світлих тонів (біла, сіра, жовта та інші). Вхідний контроль макулатури здійснюється згідно з вимогами ДСТУ 3500.

1.3. У процесі технологічного виготовлення паперу (картону) розпущення волокнистого напівфабрикату на волокна, очищення і сортування волокнистої маси, розмелювання і фібрилювання волокна проходять у водному середовищі.

1.4. У волокнистій масі в процесі її технологічного приготування за наявності води, повітря, органічних речовин та температури 15 - 40° С відбувається інтенсивне розмноження мікроорганізмів, вихідна сировина та добавки можуть уміщувати катіони важких металів. Ці фактори можуть призвести до забруднення волокнистої маси, з якої виготовляється продукція.

1.5. Зневоднення в процесі формування полотна на сітці папероробної машини, що сприяє видаленню катіонів важких металів, та термічне оброблення паперу (картону) у сушильній частині за температури 80 - 130° С забезпечують хімічну та мікробіологічну чистоту продукції на рівні вимог до пакувальних матеріалів, призначених для пакування сухих харчових продуктів.

1.6. Папір (картон) на основі макулатури, призначений для виготовлення пакувальних засобів з метою пакування сухих харчових продуктів, повинен проходити вихідний контроль за санітарно-гігієнічними показниками якості та безпечності згідно з вимогами цих ДСанПіН.

1.7. Вихідний контроль санітарно-гігієнічних та мікробіологічних показників повинен проводитись з кожної партії продукції лабораторіями, у т. ч. підприємств-виробників, акредитованих на цей вид діяльності згідно з чинним законодавством. Органолептичні дослідження проводяться на вимогу споживачів.

1.8. Державний контроль якості та безпечності паперу (картону) здійснюється установами санітарно-епідеміологічної служби не рідше одного разу на шість місяців за умов незмінності технології виробництва. Під час освоєння нових технологій або їх зміни нормативна документація (далі - НД) на виготовлення паперу (картону) повинна бути погоджена і зареєстрована згідно з установленим порядком.

2. Гігієнічні вимоги, показники якості та безпечності

2.1. Папір (картон) за показниками якості повинен відповідати вимогам чинної нормативної документації.

2.2. Використання паперу (картону) для пакування сухих харчових продуктів дозволяється за умов відповідності вимогам і нормам цих ДСанПіН.

2.2.1. За органолептичними показниками папір (картон) повинен мати:

- поверхню чисту, рівну, гладку;
- колір білий, світло-сірий, світло-жовтий та інших світлих тонів;
- інтенсивність запаху (водної витяжки) не більше одного бала.

2.2.2. За мікробіологічними показниками:

- кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (далі - МАФАМ) в 1 г паперу (картону) не більше 3×10^3 колонієутворювальних одиниць (далі - КУО);
- відсутність лактозопозитивних кишкових паличок - загальних коліформ в 5,0 г паперу (картону);
- відсутність патогенних мікроорганізмів, у т. ч. сальмонел у 10,0 г паперу (картону).

2.2.3. За санітарно-хімічними показниками:

допустимі кількості міграції (далі - ДКМ) катіонів важких металів з паперу (картону) у водній витяжці, мг/дм³:

- цинку - 1,0;
- свинцю - 0,03;

- кадмію - 0,001.

2.3. Забороняється використовувати для пакування харчових продуктів папір (картон), якість якого не відповідає вимогам і нормам цього документа хоча б за одним з показників.

2.4. Періодичність випробування паперу (картону):

2.4.1. За органолептичними показниками - один раз на шість місяців.

2.4.2. За мікробіологічними показниками:

- МАФАМ, загальні коліформи - щодоби;

- сальмонели - один раз на тиждень (за умови виробництва одного виду продукції і незмінності режимів і нормативів технологічного регламенту).

2.4.3. За санітарно-хімічними показниками (ДКМ):

- цинку, свинцю - щодоби;

- кадмію - один раз на тиждень.

3. Методика проведення органолептичних випробувань

3.1. Відбір зразків

Після зняття тамбура (рулону) паперу (картону) з паперо-картоноробної машини відбирають два - три зразки розміром $20,0 \pm 0,2 \times 10,0 \pm 0,2$ см або інших розмірів із загальною площею поверхні 400 ± 12 см² (площа визначається з обох боків паперу (картону)).

Протокол відбирання проб повинен містити таку інформацію:

- найменування підприємства-виробника;

- найменування продукції;

- позначення НД;

- номер партії;

- номер зразка;

- місце відбирання;

- дата і час відбирання зразка;

- посада і прізвище особи, що здійснює відбирання зразка;

- вид санітарно-мікробіологічних досліджень, які потрібно виконати.

3.2. Підготування зразка

3.2.1. Кожен дослідний зразок подрібнюють і вміщують в окрему скляну колбу з пробкою, заливають 400 см³ дистильованої води з температурою 20 ± 1° С і витримують 6 ± 0,2 годин. Відношення площі поверхні зразка (S) у квадратних сантиметрах (ураховуються обидва боки) до об'єму води (V) у кубічних сантиметрах повинно дорівнювати:

$$S : V = 1 : 1$$

3.2.2. Контрольною пробою повинна бути дистильована вода в колбі місткістю 400 см³, яка витримана в аналогічних умовах.

Через 6 годин водну витяжку із досліджуваних зразків паперу (картону) переливають у чисту скляну ємність, з якої беруть необхідну кількість для проведення органолептичних і санітарно-хімічних досліджень.

3.3. Органолептичні випробування

3.3.1. Випробування починається з візуального огляду сухих зразків паперу (картону), відібраних згідно з пунктом 3.1, оцінюють стан поверхні, її колір.

3.3.2. Для визначення запаху використовують водні витяжки з паперу (картону), підготовлені згідно з пунктом 3.2, готують три ємності (50 - 100) см³. У дві ємності поміщають дистильовану воду (контрольні проби), а в третю - водну витяжку з досліджуваного зразка.

Під час випробування дегустатор відкрито ознайомлюється із запахом контрольної проби однієї ємності, а потім - закрито з двома іншими пробами методом легкого вдихання повітря з них, попередньо збовтуючи (струшуючи) уміст кожної ємності.

Інтенсивність запахів оцінюють згідно з нормами:

Умова визначення	Оцінка, визначена дегустатором	Інтенсивність, бал
Відсутність відчутного запаху	-	0
Запах, що не відчуває споживач, але виявляє досвідчений дегустатор	дуже слабкий, ледь відчутний	1
Запах, що не привертає уваги споживача, але відчутний, якщо вказати на нього	слабкий	2
Запах відчутний	помітний	3
Запах, що привертає до себе увагу	виразний	4
Запах сильний, неприємний	сильний неприємний	5

4. Визначення масової концентрації катіонів важких металів

4.1. Підготування водної витяжки до випробувань

200 см³ водної витяжки з паперу (картону), підготовленої за пунктом 3.2.1, поміщають у порцелянову випарну чашу місткістю 500 см³ і додають 5 см³ 1М азотної кислоти. Випаровують уміст чаші на електричній плитці, не допускаючи розбризкування, до об'єму приблизно 30 - 40 см³. Охолоджують чашу та кількісно переносять її вміст у мірну колбу місткістю 50 см³. Ополіскують чашу невеликими порціями дистильованої води, які також додають до розчину в мірній колбі. Доводять об'єм до мітки.

4.2. Визначення масової концентрації іонів цинку, свинцю та кадмію атомно-абсорбційним методом

Виконання вимірювань масової концентрації іонів цинку, свинцю та кадмію проводять атомно-абсорбційним методом згідно з ГОСТ 30178-96 "Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов" (далі - ГОСТ 30178).

4.3. Оброблення результатів вимірювання

Для визначення масової концентрації катіонів важких металів у водній витяжці з паперу (картону) значення масової концентрації іонів металів, одержане за пунктом 7.1 ГОСТ 30178, ділять на коефіцієнт k , що чисельно дорівнює 4 (фактор концентрування об'єму водної витяжки 200 см³ до об'єму 50 см³).

5. Мікробіологічні випробування

5.1. Відбирання проб

Зразки паперу (картону) однієї партії відбирають один раз на добу через дві - три години після початку зміни. З рулону на накаті паперо-картоноробної машини вирізають чотири - п'ять шарів паперу (картону) масою не менше 50,0 г. Пробу загортають в аркуш паперу тієї самої продукції, пакують у поліетиленовий пакет і в такому вигляді доставляють до лабораторії для випробування. Відбирання зразків, транспортування, підготування до випробування проби повинні проводитися з додержанням вимог стерильності, які виключають вторинну бактеріальну контамінацію продукції.

Пробу забезпечують супроводжувальним документом, у якому наведені дані згідно з пунктом 3.1.

5.2. Основне обладнання:

- прилад для подрібнення (дезінтеграції) матеріалів з металевими або скляними посудинами ємністю 500 мл з кришками, який оснащений високошвидкісною мішалкою або іншим відповідним засобом для подрібнення паперу (картону). Перед стерилізацією на кришку кожної посудини розмішують ковпачок з паперу або алюмінієвої фольги;
- дезінтегратор іншої конструкції типу "Stomacher" або ін.;
- прилад для струшування;
- термостат, що забезпечує регулювання температури від 25 до 55° С і градієнт температури в камері $\pm 1^\circ$ С;

- водяна баня чи термостат, що здатні підтримувати температуру 45 - 50° С (для поживних середовищ);
- дистилятор, що забезпечує якість дистильованої води згідно з чинною НД, або прилад для отримання води аналітичної якості;
- ваги лабораторні загального призначення 4-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г та допустимою похибкою не більше 0,02 г;
- ваги лабораторні загального призначення 4-го класу точності з найбільшою межею зважування 1000 г та допустимою похибкою не більше 0,1 г;
- рН-метр з похибкою вимірювання до 0,01;
- стерилізатор паровий з режимами стерилізації від температури +100° С (текучою парою) до 126° С (під тиском);
- шафа сушильна стерилізаційна, яка забезпечує температуру +100 - +200° С;
- магнітні мішалки з підігрівом до 30° С для приготування середовищ;
- дозатори для розливу поживних середовищ;
- дозатори піпеточні для використання в аналізі;
- холодильники лабораторні або побутові;
- мікроскоп біологічний;
- прилад для підрахунку колоній бактерій;
- освітлювач ОИ-19.

Примітка. Допускається використання інших засобів вимірювальної техніки, допоміжного обладнання, які за технічними характеристиками не поступаються зазначеним вище.

5.3. Допоміжне обладнання і витратні матеріали:

- пальники газові або спиртові;
- анатомічні пінцети;
- бактеріологічні петлі;
- вата гігроскопічна медична;
- годинник піщаний на 1, 2, 5 хвилин або таймер;
- індикаторні смужки для визначення рН у діапазоні 6 - 8 з інтервалом 0,2;
- колби конічні об'ємом по 250, 500, 1000 см³;

- лабораторний посуд скляний або одноразового використання;
- лейкопластир;
- лійки скляні;
- марля медична, бинти;
- мензурки місткістю 100, 250, 500 см³;
- олівці чи фломастери по склу;
- папір фільтрувальний;
- пенали металеві для піпеток;
- пінцети з тупими кінцями;
- піпетки місткістю 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 см³;
- піпетки Мора на 50 і 100 см³;
- поплавки для пробірок і флаконів;
- пробірки бактеріологічні;
- скельця предметні для мікроскопії;
- стакани лабораторні;
- флакони скляні об'ємом 250, 500 см³;
- фольга алюмінієва, ковпачки силіконові, металеві;
- циліндри місткістю 100, 250, 500 см³;
- чашки бактеріологічні (Петрі);
- штативи для пробірок.

5.4. Хімічні реактиви:

Усі хімічні реактиви повинні відповідати кваліфікації не нижче ч. д. а. (чистий для аналізу):

- α -нафтол*;
- амоній-залізо (II) сульфат;
- бромтимоловий синій;
- генціан фіолетовий (генціанвіолет)*;

- глюкоза;
- діамантовий зелений;
- йод кристалічний;
- йодистий калій;
- калію дигідрофосфат;
- кислота соляна;
- лактоза;
- магнію хлорид;
- натрій сірчистоокислий (сульфіт натрію);
- натрій хлористий;
- натрію гідроксид;
- натрію гідроселеніт;
- натрію гідрофосфат безводний;
- натрію дигідрофосфат безводний;
- натрію тіосульфат;
- сахароза;
- сечовина;
- спирт етиловий ректифікований 96 %, медичний;
- феноловий червоний;
- фуксин основний;
- фенілендіамінові сполуки* (тетраметил-п-фенілендіамін гідрохлорид, диметил-п-фенілендіамін солянокислий, диметил-п-фенілендіамін, дифеніл-п-фенілендіамін та ін.).

* Речовини мають канцерогенну та мутагенну дію. Працювати з дотриманням вимог безпеки праці. Доцільно використовувати стандартні препарати промислового виробництва, зареєстровані в Україні.

5.5. Поживні середовища промислового виготовлення:

- агар сухий поживний;
- агар Ендо сухий;

- агар мікробіологічний;
- агар-агар;
- вісмут-сульфіт агар;
- дріжджовий діалізат;
- жовч великої рогатої худоби;
- магнеїєве середовище;
- пептон сухий ферментативний для бактеріологічних досліджень;
- селенітове середовище;
- середовище Гіса з лактозою;
- середовище Кеслера;
- середовище Плоскірева;
- сухий поживний бульйон.

5.6. Тест-штами мікроорганізмів

Штами *E. coli* M17-02, *Pseudomonas fluorescens* використовують для перевірки реактивів для постановки оксидазного тесту. Їх отримують у музеї патогенних мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України.

5.7. Приготування поживних середовищ і реактивів

Усі сухі поживні середовища і реактиви повинні бути дозволені до використання в Україні і мати сертифікат якості (паспорт) відділу контролю організації-виробника та інструкцію з використання.

Варто використовувати стандартизовані сухі поживні середовища промислового виробництва. У цьому разі слід дотримуватися способу приготування, використання, умов та терміну зберігання, указаних на етикетці.

Сухі поживні середовища зберігають у сухих темних приміщеннях за кімнатної температури. Відкриті упаковки щільно закривають. Середовища із зміненою консистенцією (уцільнені, з грудками) або зміненим кольором не використовують.

Приготування поживних середовищ проводиться згідно з ГОСТ 10444.1-84 "Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе".

Усі виготовлені поживні середовища маркують із зазначенням назви середовища, дати виготовлення та терміну придатності.

Дату приготування та результати контролю якості поживних середовищ реєструють у Журналі приготування та контролю поживних середовищ (форма N 256/о, затверджена наказом МОЗ України від 4 січня 2001 року N 1).

Для приготування розчинів, реактивів і поживних середовищ використовують воду дистильовану за ГОСТ 6709-72 "Вода дистилированная. Технические условия" або очищену. Готують у посуді з інертного матеріалу.

Всі середовища, які стерилізують за температури $112 \pm 2^\circ \text{C}$, готують у стерильному посуді і розливають у стерильні пробірки.

Ураховуючи можливу зміну рН поживних середовищ після кип'ятіння та стерилізації, при приготуванні середовищ установлюють рН на 0,2 вище вказаного, що визначають дослідним шляхом для кожного середовища. Остаточний контроль рН проводять у готовому середовищі з використанням рН-метра (рідкі середовища) або паперових індикаторів з шагом діапазону не більше 0,2 (агаризовані середовища). Визначення проводять згідно з інструкцією з використання приладу або індикаторної системи.

Після стерилізації поживні середовища охолоджують за кімнатної температури, після чого поміщують у холодильник за температури $6 \pm 2^\circ \text{C}$, якщо в Інструкції щодо застосування конкретного препарату не вказано інші умови зберігання.

Готові розлиті в пробірки напіврідкі поживні середовища та середовища з поплавками зберігають при кімнатній температурі не більше 7 діб.

Температуру середовищ, що зберігалися у холодильнику, перед посівом необхідно довести до кімнатної.

Температура середовища під час розливання її у чашки Петрі повинна бути $50 - 60^\circ \text{C}$.

На поверхні розлитого в чашки Петрі середовища не повинно бути слідів вологи. У разі наявності на поверхні середовища слідів вологи чашки перед використанням підсушують у термостаті.

5.7.1. Фосфатно-буферний розчин

За відсутності препарату промислового виготовлення середовище готують за таким

калію фосфат однозаміщений	- 3,63 г;
натрію фосфат двозаміщений	- 7,13 г;
вода дистильована	- до 1000 см ³ .

прописом:

Наважки солей розчиняють у 1 дм³ дистильованої води, розливають у флакони по 100 см³ або більше, закривають пробками і стерилізують в автоклаві за температури $121 \pm 1^\circ \text{C}$ та тиску 110 кПа протягом 20 хвилин.

5.7.2. Фізіологічний розчин 0,9 %-ний

9 г NaCl розчиняють у 1 дм³ дистильованої води, розливають у пробірки по 10 см³ або у флакони по 100 см³ або більше, закривають пробками і стерилізують в автоклаві за температури $121 \pm 1^\circ \text{C}$ та тиску 110 кПа протягом 20 хв. Термін зберігання не більше двох тижнів.

Фізіологічний розчин, який готують для розведень, доцільно стерилізувати у флаконах по 90 см³ та в пробірках по 9 см³.

5.7.3. Поживні середовища промислового виробництва готують з сухого препарату за способом, указаним на етикетці.

5.7.4. Середовище Кеслера з лактозою

За відсутності препарату промислового виготовлення середовище готують за таким

пептон ферментативний	- 20,0 г;
жовч великої рогатої худоби	- 100,0 см ³ ;
лактоза	- 5,0 г;
водний розчин кристалічного фіолетового 1 %	- 8,0 см ³ ;
вода дистильована	- 1000 см ³ .

прописом:

Приготування: до 1000 см³ дистильованої води додають пептон і жовч великої рогатої худоби. Суміш під час перемішування протягом 20 - 30 хвилин доводять до кипіння на водяній бані. Потім фільтрують її крізь ватно-марлевий фільтр, додають лактозу і доводять водою об'єм до 1000 см³. Установлюють рН - 7,4 - 7,6, використовуючи розчин гідроокису натрію (NaOH) або соляної кислоти (HCl) з молярною концентрацією 1,0 моль/дм³. Додають 1 %-ий водний розчин індикатора кристалічного фіолетового, розливають у флакони по 200 см³. Стерилізують за температури $112 \pm 2^\circ \text{C}$ протягом 15 ± 1 хвилин.

5.7.5. Водний розчин кристалічного фіолетового з масовою часткою 1 %.

Наважку масою $1,00 \pm 0,01$ г індикатора кристалічного фіолетового вміщують у мірну колбу місткістю 100 см³ і доводять до мітки дистильованою водою. Розчин зберігають за температури $4 \pm 1^\circ \text{C}$ протягом 7 діб.

5.7.6. Напіврідке середовище з лактозою

За відсутності препарату промислового виготовлення середовище готують за таким прописом: в 1 дм³ дистильованої води розчиняють 10 г пептону, 5 г натрію хлористого, 4 - 5 г агар-агару, доводять до кипіння, установлюють рН 7,2 - 7,4, додають 1 см³ 1,6 %-ого спиртового розчину бромтимолового синього. Стерилізують за температури $121 \pm 1^\circ \text{C}$

протягом 20 хвилин. У розплавлене середовище вносять 5 г лактози, нагрівають до кипіння, розливають у стерильні пробірки по 3 - 5 см³ і стерилізують протягом 12 хвилин за температури 112 ± 1° С.

5.7.7. Селенітове середовище

За відсутності препарату промислового виробництва середовище готують у лабораторії за

натрію гідроселеніт (без домішок телуриту) (NaHSeO ₃)	- 4,0 г;
пептон високої якості ("Діфко", "Ріхтер", "Спофа")	- 5,0 г;
натрію гідрофосфат безводний (Na ₂ HPO ₄)	- 7,0 г;
натрію дигідрофосфат безводний (NaH ₂ PO ₄)	- 3,0 г;
лактоза	- 4,0 г;
вода дистильована	- 1000 см ³ .

таким прописом:

Приготування: середовище готують з двох розчинів.

I розчин: попередньо визначають кількісне співвідношення фосфатів для даного зразка пептону чи гідроселеніту натрію з тим, щоб готове середовище мало рН 6,9 - 7,1. Таке визначення потрібно проводити кожного разу при зміні серії кожного з основних інгредієнтів, які входять до середовища.

Після встановлення співвідношення фосфатів до розчину додають пептон та лактозу. Розливають у флакони по 200 см³ і стерилізують за температури 112 ± 1° С протягом 30 хвилин.

II розчин: розчин готують ex tempore. До 100 см³ дистильованої води додають 10 г гідроселеніту натрію.

Перед початком роботи в кожний флакон з 200 см³ основного розчину (I) додають 8 см³ гідроселеніту натрію (II). Стерилізація не потрібна.

Основний розчин (I) зберігають за температури 6 ± 2° С протягом 1 - 2 місяців.

5.7.8. Магнієве середовище

При відсутності препарату промислового виробництва середовище готують у лабораторії. Середовище складається з трьох розчинів.

Розчин I

пептон	- 4,2 г;
натрію хлорид (NaCl)	- 7,15 г;
калію дигідрофосфат (KH ₂ PO ₄)	- 1,93 г;
дріжджовий діалізат	- 9,0 см ³ ;
вода дистильована	- 890 см ³ ;

Розчин II

магнію хлорид (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	- 35,7 г;
вода дистильована	- 90 см ³ ;

Розчин III

діамантовий зелений, 0,5 % водний розчин	- 0,9 см ³ .
--	-------------------------

Приготування: після розчинення при підігріванні інгредієнтів усі три розчини змішують, розливають по 200 см³ у флакони і стерилізують за температури 112 ± 1° С протягом 30 хвилин.

5.7.9. Водний розчин діамантового зеленого з масовою часткою 0,5 %

Наважку масою 0,50 ± 0,01 г індикатора діамантового зеленого вміщують в мірну колбу місткістю 100 см³ і доливають до мітки дистильованою водою. Розчин зберігають за температури 4 ± 1° С протягом 7 діб в колбі, закритій гумовою пробкою.

5.7.10. Трицукровий агар із сечовиною (Олькеницького)

За відсутності препарату промислового виробництва середовище готують у лабораторії за

агар поживний сухий	- 25,0 г;
лактоза	- 10 г;
сахароза	- 10 г;
глюкоза	- 1 г;
амоній-залізо (II) сульфат [FeSO ₄ ·(NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O]	- 0,2 г;
натрію тіосульфат (Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O)	- 0,3 г;
сечовина	- 10 г;
феноловий червоний (0,4 % водний розчин)	- 4,0 см ³ ;
вода дистильована	1000 см ³ .

таким прописом:

Приготування: солі попередньо розчиняють у невеликій кількості дистильованої води. Вуглеводи і сечовину розчиняють таким самим чином, але при підігріванні на водяній бані. Сухий поживний агар розплавляють у решті води при нагріванні на вогні і перемішуванні. Потім усі інгредієнти об'єднують, перемішують з розплавленим агаром, фільтрують крізь марлевий фільтр, установлюють рН 7,2 - 7,4. Додають індикатор, добре перемішують, розливають у пробірки по 6 - 7 см³. Стерилізують текучою парою 3 дні поспіль по 20 хвилин або за температури 112 ± 1° С протягом 15 хвилин. Скошують, залишаючи стовпчик 2,0 - 2,5 см³.

5.7.11. Реактив для визначення оксидазної активності бактерій

Оксидазний тест призначається для диференціації бактерій родини Enterobacteriaceae від родини Vibrionaceae, грамнегативних бактерій родини Pseudomonadaceae та інших сапрофітних бактерій, які мають активний фермент оксидазу та окислюють фенілєндіамінові сполуки до індофенолу яскраво-синього кольору.

Використовують готові індикаторні системи промислового виготовлення (системи індикаторні паперові (СІП-оксидаза), диски оксидази виробництва PLIVA-LACHEMA, bioMerieux) чи папірці, попередньо виготовлені за таким прописом:

30 мг α-нафтолу розчиняють у 2,5 см³ 96 %-ого етилового спирту, додають 7,5 см³ дистильованої води з 50 мг фенілєндіамінової сполуки. В отриманому розчині змочують фільтрувальні папірці, висушують і зберігають у темному місці в чорному папері не більше 6 місяців.

Використовують також таку методику:

реактив N 1. 1 %-ий спиртовий розчин α-нафтолу;

реактив N 2. 1 %-ий водний розчин фенілєндіамінової сполуки.

Розчини зберігають у темних флаконах з притертими пробками: N 1 - до одного місяця, N 2 - один тиждень. Перед застосуванням до трьох частин розчину N 1 додають сім частин розчину N 2.

З кожною новою партією реактивів, а також періодично в процесі зберігання реактивів чи готових препаратів проводять контрольні дослідження з тест-культурами мікроорганізмів, які дають позитивну реакцію (*Pseudomonas fluorescens*) і негативну реакцію (*E. coli*).

Надійний результат оксидазного тесту може бути отриманий лише при використанні добової культури, вирощеної на неселективному поживному агарі.

Увага! Для постановки тесту використовують скляну паличку або платинову петлю.

5.7.12. Постановка оксидазного тесту

З ізольованої колонії кожного типу, які вирости на секторах середовища Ендо, знімають частину колонії платиновою петлею або скляною паличкою і наносять штрихом на фільтрувальний папір, змочений реактивом. Якщо в місці нанесення бактеріальної маси

папір не змінює кольору, - оксидазний тест негативний, якщо папір синіє протягом 1 хвилини, значить бактерії мають активну оксидазу.

Дослідження ізольованих колоній є обов'язковим, інакше можна безпідставно відкинути належність досліджуваної колонії до кишкових паличок у разі посиніння за рахунок домішок оксидазопозитивних бактерій. При негативному оксидазному тесті залишок колонії при потребі пересівають на напіврідке середовище з лактозою.

5.7.13. Реактиви для фарбування за Грамом

Розчин генціану фіолетового: 1 г генціану фіолетового розчиняють у 10 см³ ректифікованого етилового спирту і додають 100 см³ дистильованої води.

Розчин Люголя: 1 г йоду кристалічного, 2 г йодистого калію розчиняють в 300 см³ дистильованої води. Зберігають у флаконі з темного скла.

Фуксин Ціля: 1 г основного фуксину розчиняють у 10 см³ спирту етилового ректифікованого і додають 100 см³ дистильованої води.

5.7.14. Фарбування за Грамом

Мазок на предметному склі фіксують трьохкратним проведенням через полум'я пальника. На препарат накладають смужку фільтрувального паперу і на нього наливають розчин генціану фіолетового на 0,5 - 1,0 хвилини. Потім знімають папір, наливають розчин Люголя на 0,5 - 1,0 хвилини, змивають розчин Люголя. Скло прополіскують в етиловому спирті протягом хвилини, поки не перестане відходити фарба. Після чого скло ретельно промивають водою та забарвлюють протягом 1 - 2 хвилин фуксином Ціля, розведеним 1:10 дистильованою водою. Після промивання і підсушування препарату мазок розглядають під мікроскопом.

Під час використання набору для фарбування за Грамом промислового виробництва користуються інструкцією до набору.

5.8. Визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФАМ).

5.8.1. Принцип методу

Визначення МАФАМ проводять методом глибинного посіву відповідної наважки паперу (картону) у поживний агар з урахуванням усіх колоній мікроорганізмів, які можна побачити при 2 - 5-кратному збільшенні, що вирости за температури $30 \pm 1^\circ \text{C}$ протягом 72 ± 2 годин у глибині та на поверхні поживного агару.

5.8.2. Приготування проб для посіву і проведення аналізу

Випробування повинні проводити висококваліфіковані спеціалісти.

Із зразків, відібраних згідно з пунктом 5.1, готують наважку із середнього шару зразків масою $2,0 \pm 0,01$ г. Зразки нарізають дрібними квадратами, поміщають у стерильну ємність для дезінтегрування, у якій міститься 200 см³ стерильного фосфатного буфера згідно з пунктом 5.7.1 (розведення 1:100), і проводять розщеплення волокон до отримання однорідної суспензії (повна дезінтеграція).

Після відстоювання проби стерильною піпеткою місткістю $1,0\text{ см}^3$ набирають $1,0\text{ см}^3$ рідини і переносять у пробірку, яка вміщує $9,0\text{ см}^3$ стерильного фізіологічного розчину, і перемішують (розведення 1:1000).

У залежності від очікуваного обсіменіння зразка аналогічно готують такі розведення.

Поживний 1,5 %-ий агар розтоплюють на водяній бані і охолоджують до температури $45 \pm 5^\circ\text{C}$. Стерильні чашки Петрі підписують і розташовують на суворо горизонтальній поверхні столу. З двох відповідних розведень кожної проби роблять посів $1,0\text{ см}^3$ у три паралельні чашки.

Після внесення проби в чашки Петрі в кожному з них заливають $10 - 12\text{ см}^3$ охолодженого поживного агару і, обережно обертаючи на поверхні столу, перемішують уміст чашки, щоб досягти рівномірного розподілу волокон у культуральному середовищі. При цьому треба запобігати утворенню бульбашок повітря, неповному заповненню дна чашки агаром, попаданню середовища на краї та кришку чашки. Чашки залишають на горизонтальній поверхні до застигання середовища, потім перевертають догори дном і ставлять у термостат.

Посіви вирощують за температури $30 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 72 ± 2 годин. Чашки з посівами розташовують у термостаті таким чином, щоб відстань між чашками та стінками термостата була не менше $3,0\text{ см}$.

Колонії, які вирости як на поверхні, так і в товщі агару, підраховують за допомогою пристрою для підрахунку колоній. Ураховують усі колонії, що вирости, але на чашці повинно бути не більше 300 колоній.

Підраховують кількість колоній мікроорганізмів у кожному з паралельних посівів одного розведення. За результатами визначають середньоарифметичне значення числа колоній в посівах одного розведення. При підрахунку враховують кратність розведення проб.

Результат виражають у колонієутворювальних одиницях в 1 г досліджуваної проби і заносять до протоколу.

Результат видають на основі підрахунку колоній на одній чашці, якщо інший підрахунок неможливий (при повзучому рості бактерій, який покриває всю поверхню чашки). Якщо на всіх чашках має місце ріст розпливчастих колоній, який не розповсюджується на всю поверхню чашки, чи виросло більше 300 колоній і аналіз не можна повторити, підраховують на секторі чашки з подальшим перерахунком на всю поверхню. У таких випадках у протоколі відмічають "число КУО в 1 см^3 - орієнтовно". Якщо підрахунок колоній на чашках неможливий, то в протоколі відмічають "зливний ріст".

Якщо результат у межах чисел від 1 до 100, то записують отримане число. Якщо результат у межах чисел від 101 до 1000, то результат заокруглюють до десятків. Якщо результат у межах чисел від 1001 до 10000, то результат заокруглюють до сотень і т. ін.

5.9. Визначення лактозопозитивних кишкових паличок - загальних коліформ

5.9.1. Визначення поняття показника

До лактозопозитивних кишкових бактерій (далі - ЛКБ) відносяться грамнегативні, що не утворюють спор, палички, які зброджують лактозу з утворенням кислоти та газу за температури $(36 \pm 1)^\circ \text{C}$ протягом (24 - 48) годин і в яких відсутня оксидазна активність.

5.9.2. Сутність методу

Сутність методу полягає у визначенні наявності ЛКБ (загальних коліформ) у 5,0 г паперу (картону) шляхом посіву проби в живильне середовище накопичення (Кеслера), вирощування за температури $36 \pm 1,0^\circ \text{C}$ з наступним висівом на селективне середовище Ендо і диференціацією колоній.

5.9.3. Приготування проб для посіву і проведення випробування

Із зразка, відібраного згідно з пунктом 5.1, готують наважку 5,0 г, нарізають дрібними квадратами і вносять у стерильну ємність дезінтегратора з 200 см^3 середовища Кеслера, дезінтегрують до повного розщеплення волокон і отримання однорідної маси, яку переносять у стерильний флакон об'ємом 500 см^3 у разі використання стерильних поліетиленових пакетів у дезінтеграторі типу "Stomacher".

Підготовлену таким чином пробу розміщують у термостаті за температури $36 \pm 1^\circ \text{C}$ на 48 годин.

Під час обліку результатів відмічають наявність ознак росту мікроорганізмів: помутніння середовища і утворення пухирців газу, помутніння середовища без наявності газу. Відсутність ознак росту через 48 годин свідчить про негативний результат - відсутність ЛКБ у 5 г паперу (картону). За наявності ознак росту роблять пересів на середовище Ендо так, щоб отримати ізольовані колонії (відсутність ізольованих колоній не дає змоги продовжувати аналіз і потребує розсіву для отримання росту ізольованих колоній).

Чашки з середовищем Ендо інкубують при $36 \pm 1^\circ \text{C}$ протягом 16 - 18 годин.

Під час урахування результату пересіву із середовища накопичення на середовище Ендо можливі два основні варіанти:

- на чашках або окремих секторах відсутній ріст колоній або вирости не типові для ЛКБ колонії (бліді-рожеві, плівчасті, зморщені, губчасті з нерівними краями тощо). Відмічають відсутність ЛКБ у досліджуваній пробі;

- на чашках або секторах Ендо вирости типові для ЛКБ колонії: темно-червоні та червоні з металевим блиском або без нього, рожеві з червоним центром і відбитком на середовищі, що вказує на ферментацію лактози і утворення альдегіду. Їх належність до ЛКБ підтверджують мікроскопією і постановкою оксидазного тесту. При виявленні оксидазонегативних, грамнегативних паличок колонії кожного типу засівають уколом у напіврідке середовище з лактозою, яке попередньо бажано підігріти до 37°C . При цьому забирають якомога більше посівного матеріалу. Пробірки з посівами інкубують у термостаті за температури $36 \pm 1^\circ \text{C}$ протягом 4 - 6 годин. За утворення кислоти та газу дають позитивну відповідь. При відсутності чіткого росту або утворенні тільки кислоти продовжують інкубацію до 24 годин. Якщо виявлено тільки кислоту, то досліджувані колонії не належать до ЛКБ. Ферментація лактози з утворенням кислоти та газу свідчить про наявність ЛКБ у 5,0 г паперу (картону), у цьому випадку видають позитивний результат.

5.10. Визначення патогенних мікроорганізмів, у т. ч. бактерій роду сальмонела.

5.10.1. Визначення поняття показника

Сальмонели - це факультативно-анаеробні грамнегативні неспороутворювальні палички, які добре ростуть на простих поживних середовищах, рухливі, крім *S. gallinarum-pullorum*. При ферментації глюкози утворюють газ за невеликим винятком (*S. typhi*, *S. typhisuis* та ін.), не ферментують лактозу та сахарозу, продукують сірководень. Ідентифікацію сальмонел проводять за рядом біохімічних тестів та за антигенною структурою, що виявляється в реакції аглютинації на склі з О- та Н-аглютинувальними сироватками.

5.10.2. Принцип методу

Метод полягає в накопиченні сальмонел у селективних рідких поживних середовищах, селекції на двох різних диференційно-поживних середовищах та ідентифікації виділених мікроорганізмів за біохімічними і серологічними ознаками.

5.10.3. Приготування проб для посіву і проведення випробування

Із зразка, відібраного згідно з пунктом 5.1, готують дві наважки по 10,0 г, нарізають дрібними квадратами і вносять одну з них у стерильну ємність дезінтегратора з 200,0 см³ селенітового середовища, а другу - з 200,0 см³ магнієвого середовища. Наважки в середовищах дезінтегрують до утворення однорідної маси, яку переносять у стерильні флакони об'ємом 400 - 500 см³, у разі використання стерильних поліетиленових пакетів у дезінтеграторі типу "Stomacher".

Підготовлену таким чином пробу розміщують у термостаті за температури $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ на 24 години (селенітове середовище) та протягом 48 годин (магнієве середовище).

З обох середовищ виконують пересів на щільні диференційно-селективні середовища: чашки з вісмут-сульфіт агаром, середовищем Ендо і Плоскірева. Чашки інкубують за температури $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 24 годин, з вісмут-сульфіт агаром - 48 годин.

Після інкубації чашки переглядають і відзначають підозрілі на сальмонели колонії. На середовищах Ендо, Плоскірева - це безбарвні або блідо-рожеві злегка опуклі блискучі колонії.

На вісмут-сульфіт агарі колонії сальмонел сіро-чорні з металевим блиском навкруги. Середовище під колонією набуває чорного забарвлення. Можливий ріст колоній з чорним центром і напівпрозорим краєм, а також невеликих плоских колоній темно-зеленого кольору. У міру старіння колоній з'являються піднятий центр і валик навколо центру.

Колонії сальмонел легко знімаються з агару, їм не властива слизувата або клейка консистенція.

З чашок відбирають по 2 - 3 підозрілі колонії кожного типу і засівають у пробірки з середовищем Олькеницького. Штрихом засівають скошену частину й уколом - стовпчик. Пробірки із середовищем Олькеницького інкубують за температури $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 24 годин.

5.10.4. Облік результатів

Облік результатів проводять відповідно до ознак, наведених у додатку, які дають змогу зробити первинну ідентифікацію. Подальше вивчення отриманих підозрілих на сальмонели культур проводиться за загальноприйнятими методиками.

Якщо при висіві із середовищ збагачення на диференційно-селективні середовища підозрілих колоній не виявлено, може бути видана відповідь про негативний результат дослідження - сальмонели в 10,0 г паперу (картону) не виявлені.

**Директор Департаменту державного
санітарно-епідеміологічного нагляду**

А. М. Пономаренко

Додаток
до пункту 5.10.4 Державних санітарних
правил і норм "Папір і картон на основі
макулатури, призначені для пакування
сухих харчових продуктів. Гігієнічні
вимоги, критерії оцінки якості і
безпеки, методи визначення"

Первинна ідентифікація ентеробактерій за біохімічними реакціями в комбінованому середовищі

Реакція в середовищі Олькеницького				Можливі ентеробактерії*
лактоза або сахароза	глюкоза	сірководень	сечовина	
-	К	-	-	Shigella, деякі серовари сальмонел, Escherichia, Hafnia, P. inconstans, Serratia, Y. enterocolitica
-	КГ	-	-	S. paratyphi A і деякі інші серовари сальмонел, деякі біовари S. flexneri 6, Escherichia, Hafnia, P. inconstans, Serratia
-	К	+	-	S. typhi та деякі інші серовари сальмонел
-	КГ	+	-	Salmonella, Citrobacter, Edwardsiella
+	К	-	-	Escherichia, Citrobacter або не ентеробактерії
+	КГ	-	-	Escherichia, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia
+	КГ	+	-	Citrobacter

•	•	•	+	Proteus (крім P. inconstans), Yersinia
•	Г	•	+	Proteus (крім P. inconstans)
-	-	-	-	Не ентеробактерії
+	-	-	-	Не ентеробактерії

Умовні позначення: К - кислота, КГ - кислота та газ, Г - газ, • - облік реакції важкоздійсненний, - реакція негативна, + реакція позитивна.

* - не включено відомостей за родом *Erwinia*, оскільки при звичайному (37° С) культивуванні посівів ці ентеробактерії, як правило, не ростуть або дають повільний скупий ріст.

**Директор Департаменту державного
санітарно-епідеміологічного нагляду**

А. М. Пономаренко

© Інформаційно-аналітичний центр «ЛПА», 1991 - 2012
© ТОВ «ЛПА:ЗАКОН», 2007 - 2012

