
ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EASC)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARTIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
(первая редакция)

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ

**Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе
полимеразной цепной реакции**

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

Издание официальное

Минск
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации
202_

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 526 «Функциональные пищевые продукты»

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 202_ г. № ____)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от _____ г. № _____ межгосударственный стандарт ГОСТ _____ введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с _____

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным органам по стандартизации этих государств

Содержание

1 Область применения.....	
2 Нормативные ссылки.....	
3 Термины, определения и сокращения.....	
4 Требования безопасности.....	
5 Оборудование, посуда, реактивы, питательные среды, сыворотки, штаммы.....	
6 Условия проведения анализа	
7 Подготовка к анализу.....	
8 Отбор и подготовка проб к анализу.....	
9 Выделение ДНК из анализируемого материала (экстракция ДНК из анализируемых проб).....	
10 Проведение ПЦР-анализа.....	
11 Оценка жизнеспособности патогенных микроорганизмов в анализируемых пищевых продуктах.....	
12 Учет и интерпретация результатов.....	
Приложение А (справочное) Информация о применяемых нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ	
Приложение Б (справочное) Приготовление посуды и материалов, растворов, реактивов и питательных сред для предварительного и селективного обогащения микроорганизмов...	

Введение

Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе полимеразной цепной реакции являются альтернативными бактериологическому посеву и предусматривают ускоренное определение наличия или отсутствия ДНК и, соответственно, бактерий родов *Salmonella*, *Shigella*, *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*), энтерогеморрагических *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter spp.* видов *C. jejuni*, *C. coli*, *C. Lari*, *Listeria monocytogenes* в определенной массе (объеме) пищевого продукта, подвергнутого инкубации в жидких селективных питательных средах. Предварительная инкубация продуктов в питательных средах является обязательным этапом анализа, обеспечивающим биологическое накопление возбудителей.

При наличии эпидемиологических данных о возможности массового заражения пищевого продукта искомыми возбудителями в ходе расследования вспышек пищевых отравлений и инфекций допускается анализировать инкриминированные пробы нативных (не подвергавшихся инкубации в жидких средах обогащения) пищевых продуктов с целью получения предварительных данных о причинном агенте вспышки. При этом положительные результаты ПЦР-анализа таких проб должны подтверждаться выделением возбудителя в культуре, а отрицательные результаты не должны интерпретироваться и не могут служить основанием для прекращения анализа проб с инкубацией.

Обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией основано на выявлении последовательностей (фрагментов) ДНК, специфичных для геномов бактерий родов *Salmonella*, *Shigella*, *Cronobacter*, *Campylobacter*, энтерогеморрагических *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*. В основе метода лежит амплификация нуклеотидных фрагментов-мишеней ДНК ферментом Гэд-полимеразой в присутствии синтетических олигонуклеотидных праймеров и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Гибридизация флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, присутствующих в составе реакционной смеси, с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени сопровождается нарастанием флуоресценции. Измерение интенсивности флуоресцентного сигнала позволяет регистрировать накопление продуктов амплификации. Методы предусматривают высев определенных количеств исследуемых проб пищевых продуктов в соответствующие неселективные и селективные питательные среды, инкубирование посевов для накопления микроорганизмов, экстракцию ДНК из культуральной жидкости, амплификацию участка ДНК целевых бактерий со

специфичными праймерами и гибридизационно-флуоресцентную детекцию ампликонов, осуществляемую в одном из двух вариантов, в режиме реального времени в ходе ПЦР либо после завершения амплификации.

При положительных результатах обнаружения патогена жизнеспособность присутствующих в продукте искомым микроорганизмов подтверждают бактериологическим посевом с соответствующим биохимическим и серологическим типированием или ПЦР-анализом парных проб (прошедшей и не прошедшей культуральное обогащение) в режиме реального времени.

Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией могут использоваться для тестирования бактериальных культур микроорганизмов, выделенных из пищевых продуктов бактериологическими методами, с целью подтверждения их принадлежности к родам *Salmonella*, *Shigella*, *Cronobacter*, *Campylobacter* (видов *C. jejuni*, *C. Coli*, *C. lari*), *Listeria* (вида *L. monocytogenes*), энтерогеморрагическим *E. coli* в качестве дополнительных к биохимическим и серологическим методам идентификации.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ

Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе полимеразной цепной реакции

Specialized food products. Methods for the detection of foodborne pathogens based on polymerase chain reaction

Дата введения —

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на специализированную пищевую продукцию и устанавливает методы выявления патогенных бактерий родов *Salmonella*, *Shigella* (в комплексе с энтероинвазивными *E. coli*), *Cronobacter*, энтерогеморрагических веротоксигенных *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter spp.* видов *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, а также *Listeria monocytogenes* на основе полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 1341 Пергамент растительный. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2768 Ацетон технический. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4148 Реактивы. Железо (II) сернокислородное 7-водное. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6038 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6687.0 Продукция безалкогольной промышленности. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7702.2.0 Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям

ГОСТ 9792 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 10444.1 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 11683 Пиросульфит натрия технический. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 12302 Пакеты из полимерных пленок и комбинированных материалов. Общие технические условия

ГОСТ 13646 Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 21237 Мясо. Методы бактериологического анализа

ГОСТ 21239 Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 23932 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26313 Продукты переработки фруктов и овощей. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 26669 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26809.1 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 26809.2 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 2. Масло из коровьего молока, спреды, сыры и сырные продукты, плавленые сыры и плавленые сырные продукты

ГОСТ 27987 Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия

ГОСТ 28489 Микроскопы световые. Термины и определения

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 30390 Услуги общественного питания. Продукция общественного питания, реализуемая населению. Общие технические условия

ГОСТ 30712 Продукты безалкогольной промышленности. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 30726 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*

ГОСТ 31339 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 31598 Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31659 (ISO 6579-1:2017) Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод обнаружения, подсчета и серотипирования бактерий рода *Salmonella*. Часть 1. Обнаружение *Salmonella spp.*

ГОСТ 31747 (ISO 4831:2006, ISO 4832:2006) Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 31761 Майонезы и соусы майонезные. Общие технические условия

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 32010 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Shigella*

ГОСТ 32031 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria spp.*)

ГОСТ 32189 Маргарины, жиры для кулинарии, кондитерской, хлебопекарной и молочной промышленности. Правила приемки и методы контроля

ГОСТ 32261 Масло сливочное. Технические условия

ГОСТ 32262 Масло топленое и жир молочный. Технические условия

ГОСТ 32901 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 32951 Полуфабрикаты мясные и мясосодержащие. Общие технические условия

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 10272-1 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter spp.* Часть 1. Метод обнаружения

ГОСТ ISO 16140 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов

ГОСТ ISO 22118 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения и количественного учета патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Технические характеристики

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ ISO 16140, ГОСТ ISO 22118, нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

В настоящем стандарте приведены следующие сокращения:

ЗПВ — забуференная пептонная вода;

МКТ-бульон — Мюллер-Кауфман тетраэтилатный бульон;

МПА — мясо-пептонный агар;

МПБ — мясо-пептонный бульон;

ОК — отрицательный контроль;

ПАЛ — питательный агар для выделения листерий;

ПБЛ — питательный бульон для выделения листерий;

ПЦР — полимеразно-цепная реакция;

ТСАДЭ/TSYEA — триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом;

ТСБДЭ/TSYEB — триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом;

ФБР — фосфатно-буферный раствор;

ALOA — агар *Listeria* по Оттавиани и Агости;

BSA — висмут-сульфит агар;

CSB — *Cronobacter* селективный бульон;

МКТТn-бульон — Мюллера-Кауфмана тетраэтилатно-новобиоциновый;

MSRV-агар — модифицированный полужидкий селективный агар Раппопорта-Василиадиса;

PBS — фосфатно-солевой буфер;

RVS-бульон — среда Раппопорта-Василиадиса с соей;

TSB — трипказо-соевый бульон;

UVM — селективный накопительный бульон;

VP - реакция Фогеса-Проскауэра;

XLD - ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар.

П р и м е ч а н и е — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

4 Требования безопасности

4.1 Условия безопасного проведения работ

4.1.1 При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- воздух рабочей зоны должен соответствовать ГОСТ 12.1.005;
- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021.

Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать гигиенических нормативов, действующих на территории государства, принявшего стандарт.

4.1.2 При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.018.

4.1.3 Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.1.4 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

4.1.5 Микробиологические исследования проводят с соблюдением требований ГОСТ ISO 7218, по нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

4.1.6 Помещения, в которых проводят посевы, дезинфицируют с помощью бактерицидных облучателей. количество и мощность которых определяют, рассчитывая объем дезинфицируемого помещения и время его обработки. Допускается проводить микробиологический посев в боксе биологической без опасности класса II.

4.1.7 При работе в зоне подготовки и выделения нуклеиновых кислот из проб, содержащих патогенные биологические агенты, необходимо строго соблюдать правила техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены: работают только в боксированном помещении или в боксе биологической безопасности II класса, используют одноразовые перчатки, используют и меняют при каждой операции одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) обеззараживают в специальном контейнере с дезинфицирующим средством по 5.3.3.

4.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению испытаний и обработке результатов допускаются лица с высшим или средним специальным образованием с опытом работы в микробиологической лаборатории, освоившие методы ПЦР – анализа и прошедшие инструктаж по технике безопасности при работе с вредными веществами и пожарной безопасности. Персонал должен допускаться к работе в одноразовой лабораторной одежде (халат, шапочка, резиновые или пластиковые перчатки, маска, бахилы).

П р и м е ч а н и е — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

5 Оборудование и расходные материалы.

Используют лабораторное оборудование для микробиологических исследований согласно ГОСТ ISO 7218 и оборудование для ПЦР-анализа, в частности следующее.

5.1 Оборудование и средства измерения

Амплификатор программируемый для проведения качественного и количественного анализа ДНК методом полимеразной реакции в режиме «реального времени» и «по конечной точке», с использованием различных комбинаций реагентов-флуорофоров и с возможностью регистрации флуоресцентного сигнала не менее чем по четырем каналам.

Аппарат для сухой стерилизации (стерилизационный сушильный шкаф) или влажной стерилизации (автоклав) по ГОСТ ISO 7218.

Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру от 0 до 100°C.

Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) или ламинарный шкаф класса биологической безопасности II тип А.

Весы лабораторные общего назначения, 2 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 1000 г по ГОСТ OIML R 76-1.

Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3000 об/мин.

Денситометр для бактериальных суспензий.

Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды, соответствующей ГОСТ 6709.

Дозаторы пипеточные автоматические с переменным объемом дозирования от 0,1 до 1000 мм³ с точностью $\pm 0,8$ %.

Гомогенизатор бактериологический перистальтического типа.

Инкубаторы-анаэроостаты или другие устройства, создающие анаэробные условия культивирования.

Микроскоп биологический бинокулярный с увеличением 900^x—1000^x с иммерсионной системой по ГОСТ 28489.

Микроцентрифуга настольная типа эппендорф (частота вращения не менее 13 000 мин⁻¹).

Морозильная камера, поддерживающая температуру не выше минус (20 $\pm$ 5)°C.

Насос вакуумный (водоструйный).

Облучатель бактерицидный настенный с мощностью бактерицидных ламп 30 Вт и производительностью (95 % обеззараживания) не менее 300 м³/час.

pH-метр, имеющий точность калибровки $\pm 0,1$ единицы pH с диапазоном измерения pH от 3,0 до 8,0 при температуре 25°C.

Системы экстракции ДНК/РНК роботизированные.

Система (аппарат) для мембранной фильтрации.

Стандарт МакФарланда или отраслевой стандарт для визуальной оценки мутности ОСО-42-28—85П № 10.

Стекла предметные и покровные.

Термостат твердотельный для пробирок типа эппендорф вместимостью 1,5 см³, диапазон температур от 25 до 100°C.

Термостат электрический суховоздушный с диапазоном рабочих температур от 20 до 60°C и отклонением от заданной температуры не более ± 1 °C.

Холодильник, поддерживающий температуру (5 $\pm$ 3)°C.

Часы механические сигнальные по ГОСТ 14919.

5.2 Лабораторная посуда и материалы

Одноразовое оборудование является приемлемой альтернативой стеклянной посуде, если оно имеет подходящие технические характеристики.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Колбы стеклянные плоскодонные конические или круглые различной вместимости по ГОСТ 1770.

Контейнеры стерильные из полимерных материалов с крышками для отбора проб.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

Микропробирки для ПЦР стерильные тонкостенные 0,2 см³ (плоская крышка, коническое дно) — для амплификаторов с детекцией через дно пробирки; 0,2 см³ (куполообразная крышка) — для амплификаторов с детекцией через крышку.

Наконечники одноразовые с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования от 0.1 до 1000 мм³.

Ножницы медицинские по ГОСТ 21239.

Оптические стандарты МакФарланда №1, 2, 3.

Пакеты полимерные для стерилизации лабораторных принадлежностей и обеззараживания отходов.

Пакеты бумажные для стерилизации лабораторных принадлежностей.

Пакеты полимерные по ГОСТ 12302.

Петли бактериологические калиброванные на 1 мм³.

Пергамент по ГОСТ 1341.

Стерильные градуированные пипетки и/или автоматические пипетки номинальной вместимостью 25 см³, 10 см³, 1 см³ и 0,1 см³.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 29227.

Пробирки типа эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 см³.

Пробки силиконовые, целлюлозные, ватно-марлевые для стеклянных колб, флаконов, пробирок.

Планшеты иммунологические 96-луночные стерильные.

Пробирки центрифужные конические стерильные вместимостью 15 и 50 см³.

Пробирки стеклянные типов П1, П2 по ГОСТ 25336.

Пробирки Дархама (поплавки) стеклянные.

Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100°С (цена деления шкалы 1°С) по ГОСТ 13646.

Термоконтeйнер (сумка-холодильник).

Фильтры мембранные микроцеллюлозные стерильные № 3.

Фильтрующие насадки на шприц.

Флаконы и колбы стеклянные по ГОСТ 25336 вместимостью 250, 500, 1000, 2000 см³.

Халаты, шапочки, маски, бахилы одноразовые, перчатки резиновые или латексные неопудренные.

Чашки биологические (Петри) стеклянные и/или стерильные чашки Петри, диаметром 90 мм и (при необходимости) большего размера (диаметром 140 мм).

5.3 Питательные среды и реактивы, дезинфицирующие средства.

5.3.1 Реагенты для ПЦР

Комплекты реагентов (наборы) для выделения ДНК/РНК из пищевой продукции.

Комплекты реагентов для роботизированных систем экстракции ДНК/РНК (силика магнитная, буфер лизирующий, буферы для экстракции).

Комплекты реагентов (наборы) для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, обеспечивающие аналитическую чувствительность на уровне $1 \cdot 10^3$ ГЭ/см³ в отношении выявляемых фрагментов ДНК патогенных бактерий *Cronobacter sakazakii*, энтерогеморрагических *E.coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* (видов *C.jejuni*, *C.coli*, *C.lari*) и *Listeria monocytogenes*, содержащие: смеси олигонуклеотидных праймеров на участки ДНК бактерий и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам амплифицируемых ДНК-мишеней; полимеразу (TaqF), смесь буфера и нуклеозидтрифосфатов. ДНК-буфер, положительные контрольные образцы этапа ПЦР со специфическими фрагментами ДНК искомым микроорганизмов и внутренним контрольным образцом, отрицательный контрольный образец и внутренний неконкурентный контрольный образец этапа выделения, минеральное масло для ПЦР.

5.3.2 Реактивы, питательные среды и их компоненты для предварительного и селективного обогащения микроорганизмов.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Ацетон по ГОСТ 2768.

Добавка ростовая азотолерантная на основе натрия пировинограднокислого, железа (II) сернокислого, натрия метабисульфита для кампилобактерий.

Агар/бульон триптон-соевый с дрожжевым экстрактом (TSYEA / TSYEB) сухой.

Агар/бульон Трипказо-соевый (TSA/TSB) сухой.

Агар/бульон Мясопептонный (МПА/МПБ) сухой.

Агар *Listeria* по Оттавиани и Агости (ALOA) сухой

Агар с мочевиной (Кристенсена) сухой.

Агар модифицированный полужидкий селективный Раппопорта-Василиадиса (MSRV).

Агар трехсахарный с железом (TSI-агар) сухой.

Агар Оксфорд (Oxford agar) сухой.

Агар Палкам (PALCAM agar) сухой.

Агар питательный для выделения листерий (ПАЛ) сухой .

Агар Бриллианс *Listeria* (BRILLIANCE LISTERIA agar) сухой.

Агар ксилоза-лизин-дезоксихолатный (XLD-агар) сухой.

Бульон Дойла для накопления кампилобактерий.

Бульон глюкозный с бриллиантовым зеленым и желчью.

Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью.

Бульон Мак-Конки с глюкозой.

Бульон Престона для накопления кампилобактерий.

Бульон селенитовый в модификации Лейфсона.

Бульон Фразера полуконцентрированный (Half Fraser broth).

Бульон Фразера для вторичного обогащения (Fraser broth).

Бульон селективный накопительный (UVM).

Бульон селективный накопительный (UVM II) сухой.

Бульон питательный для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I).

Бульон питательный для выделения и культивирования листерий ПБЛ II сухой.

Бульон для бактерий рода *Shigella* - среда обогатительная селективная (сухая).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Генцианвиолет.

Гидролизат казеина ферментативный.

D-глюкоза по ГОСТ 6038.

Добавки селективные антибиотиков для кампилобактерий, модифицированные по ГОСТ ISO 10272-1.

Железо (II) сернокислое по ГОСТ 4148.

Желчь крупного рогатого скота сухая.

Забуференная пептонная вода (ЗПВ) для предварительного неселективного обогащения (сухая).

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.

Кислота соляная по ГОСТ 3118

Кристаллический фиолетовый.

Кровь баранья дефибринированная для питательных сред стерильная.

Коммерческие наборы для окраски по Граму - согласно инструкции производителя.

Коммерческие наборы для биохимической ручной идентификации – согласно инструкции производителя.

L-цистеина гидрохлорид.

L-лизин-декарбоксилазная среда (LDC, L-Lysine decarboxylation medium).

Мюллера-Кауфмана тетрационатно-новобиоциновый бульон (МКТТн-бульон) сухой

Мясо-пептонный бульон (МПБ) с 1 % глюкозы.

Мультимикротесты для биохимической идентификации энтеробактерий.

Набор реагентов для окраски по Граму.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Натрий фосфорнокислый однозамещенный безводный.

Натрий фосфорнокислый двухзамещенный безводный.

Натрия гидросульфит.

Натрия сукцинат.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.

Натрий пировинограднокислый.

Натрий метабисульфит по ГОСТ 11683.

Пептон мясной ферментативный по ГОСТ 13805.

Пептон соевый.

Сафранин.

Среда Кесслер с глюкозой.

Среда Кесслер с лактозой.

Среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон).

Среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) сухая.

Экстракт мясной сухой бактериологический.

Экстракт дрожжевой сухой.

Приготовление и контроль качества питательных сред осуществляют в соответствии с ГОСТ ISO 11133.

Компоненты и реактивы, приготовление питательных сред из компонентов, , для предварительного и селективного обогащения микроорганизмов приведены в приложении В.

5.3.3 Дезинфицирующие средства

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Средства дезинфицирующие на основе трихлоризоциануровой кислоты, натриевой соли трихлоризоциануровой кислоты.

Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования с техническими характеристиками не хуже указанных в настоящем стандарте. Допускается использование других реактивов по качеству и чистоте не ниже вышеуказанных.

5.4 Тест-штаммы

Тест-штаммы контрольные бактерий *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter* (*E. sakazakii*), *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Salmonella typhimurium* & *enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* энтеротоксигенных серотипа

O157:H7 или других серотипов, типичные по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам.

В качестве контрольных штаммов используют референсные тест-штаммы в соответствии с номерами WDCM (Всемирный центр данных по микроорганизмам, "www.wfsc.info"), или контрольные эталонные штаммы из национальных коллекций микробных культур, или другие штаммы в соответствии с ГОСТ ISO 11133. Для некоторых национальных ограничений и указаний может потребоваться использование другого серовара *Salmonella*. Необходимо ссылаться на национальные требования, касающиеся выбора сероваров *Salmonella*.

Тест-штаммы должны быть снабжены «Паспортом штамма», выданным национальной или международной коллекцией микроорганизмов, видовая или родовая принадлежность контрольных штаммов должна быть подтверждена с использованием биохимических и генотипических методов.

Тест-штаммы необходимо сохранять в лиофильно высушенном виде. При регулярном использовании допускается сохранять в полужидком агаре для бруцелл в пробирках с плотно притертыми пробками, в защищенном от света месте, при температуре $(5 \pm 1) ^\circ\text{C}$ с еженедельным пересевом.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов, материалов, питательных средств и диагностических препаратов аналогического назначения по качеству не ниже вышеуказанных.

6 Условия проведения анализов

При подготовке и выполнении анализов в лаборатории соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха — $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха — не более 80 %.

7 Подготовка к анализу.

7.1. Приготовление питательных сред.

Среды сухие промышленного изготовления готовят из сухих сред/реактивов (5.3.2.) в соответствии с инструкциями производителя относительно приготовления, условий хранения, срока годности и использования.

Допускается для предварительного и селективного обогащения микроорганизмов применение питательных сред (реактивов) аналогичного назначения, указанных в ГОСТ для обнаружения соответствующих родов микроорганизмов:

- *Salmonella* - по ГОСТ 31659;
- *Shigella* – по ГОСТ 32010;
- *Escherichia coli* – по ГОСТ 31708;
- термофильных *Campylobacter spp* – по ГОСТ ISO 10272-1, ГОСТ ISO 10272-2;
- *Listeria monocytogenes* – по ГОСТ 32031;
- *Cronobacter spp* – по ГОСТ ISO 22964.

7.2. Допускается применение сред лабораторного приготовления из отдельных компонентов. Приготовление растворов, реактивов и питательных сред из компонентов и реактивы для предварительного и селективного обогащения микроорганизмов (приложение Б) проводят в соответствии с ГОСТ ISO 7218 и ГОСТ ISO 11133.

7.3. Допускается применение питательных сред (реактивов) аналогичного назначения, зарегистрированных и разрешенных к применению на территории государств, принявших стандарт, обеспечивающих соответствующую ГОСТ ISO 11133 специфическую активность (показатели чувствительности среды, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов), дифференцирующие и ингибирующие свойства.

8 Отбор и подготовка проб к анализу

8.1 Общие положения

8.1.1 Отбор проб не является частью метода, изложенного в настоящем стандарте. Отбор проб пищевых продуктов для анализа проводят согласно методам отбора по ГОСТ 31904, ГОСТ ISO 7218, а также в соответствии с требованиями нормативных документов на конкретные виды продуктов.

8.1.2 От продукции в потребительской упаковке в мелкой фасовке пробы отбирают в количестве одной или нескольких единиц в зависимости от массы или объема потребительской упаковки. От продукции в транспортной или потребительской упаковке больших размеров или неупакованной отбирают точечные пробы с помощью стерильных инструментов из разных мест с различной глубины, включая поверхность, небольшими порциями (около 50 г), в которых должны быть представлены все компоненты продукта. Пробы жидких и полужидких продуктов отбирают после тщательного перемешивания. Точечные пробы соединяют в объединенную пробу и перемешивают.

8.1.3 Проба для проведения испытаний должна быть представительной, не поврежденной и не измененной в процессе транспортирования и временного хранения (ISO 7218). Общая масса или объем отбираемых проб должны быть достаточными для проведения анализа — (200 ± 50) г/см³.

8.1.4 Пробы, взятые для анализа, помещают в стерильные флаконы, стерильные контейнеры из полимерных материалов с крышками, стерильные банки с целлюлозными или ватно-марлевыми пробками; пробы в потребительской упаковке — в новые пакеты из полимерных материалов по ГОСТ 12302. Пробы сыпучих продуктов допускается отбирать в стерилизованные бумажные пакеты; суточные пробы блюд допускается отбирать непосредственно в той посуде, в которой они хранились в холодильнике пищеблока.

Для анализа на наличие микроаэрофильных бактерий рода *Campylobacter* пробы твердых продуктов отбирают в стерильные полимерные пакеты, пробы жидких продуктов — в контейнеры стерильные с крышками.

8.1.5 Отобранные пробы пломбируют или опечатывают, маркируют.

8.1.6 Доставку проб скоропортящихся продуктов в лабораторию осуществляют в термоконтейнерах при температуре не выше 6 °С; замороженных продуктов — при температуре, указанной в нормативных документах на продукты. Анализ доставленных проб проводят по возможности в кратчайшие сроки, но не более чем через 4 ч от момента отбора.

8.2 Первичная обработка пищевых продуктов и подготовка их к посеву в среды обогащения

8.2.1 Для предотвращения ингибиции или утраты жизнеспособности патогенной флоры все манипуляции с пробами пищевых продуктов необходимо осуществлять с учетом биологических особенностей и чувствительности искомых патогенных бактерий к изменениям температуры, pH и окислительно-восстановительного потенциала, к воздействию УФ, нагреванию, длительному хранению.

8.2.2 До проведения анализа пробы сохраняют в сухом, защищенном от света месте, в том числе пробы скоропортящихся продуктов — при температуре (4 ± 2) °С, охлажденных сырых мясных и рыбных продуктов — при температуре (2 ± 2) °С. После вскрытия упаковки пробы подвергают анализу немедленно.

8.2.3 Подготовка проб проводят по ГОСТ 26669, ГОСТ ISO 7218, а также в соответствии с действующими нормативными документами на конкретные виды продуктов:

- проб мяса, включая мясо птицы, субпродуктов, мясных полуфабрикатов, колбасных изделий и других мясных продуктов — по ГОСТ 21237, ГОСТ 32951, ГОСТ 9792, ГОСТ 7702.2.0;

- проб молока, молочных и молокосодержащих продуктов — по ГОСТ 26809.1, ГОСТ 26809.2, ГОСТ 32901;

- проб рыбы, рыбных и морепродуктов — по ГОСТ 31339;

- проб плодоовощной продукции — по ГОСТ 26313;

- жировых продуктов — по ГОСТ 32189, ГОСТ 31761, ГОСТ 32261, ГОСТ 32262;

- напитков — по ГОСТ 6687.0, ГОСТ 30712;

- продуктов и блюд общественного питания — по ГОСТ 30390.

8.2.4 Замороженные продукты предварительно размораживают в защищенном от света месте при температуре $(2 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение не более 18 ч или в течение 1 ч в термостате при температуре $(19 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Пробы масложировой продукции (топленое масло из коровьего молока, молочный жир, спреды, топленые смеси, маргарины, кремы на растительных маслах) расплавляют при температуре 40—45 °C на водяной бане, перемешивают до получения однородной эмульсии; масло сливочное и мороженое — до сметанообразной консистенции.

8.2.5 Отобранные объединенные пробы доводят до однородной консистенции для суспендирования содержащихся в пробе микроорганизмов: жидкие и порошкообразные перемешивают, твердые измельчают в перистальтическом гомогенизаторе (пробы с плотной консистенцией предварительно измельчают ножницами или добавляют определенные количества соответствующей среды для неселективного или селективного обогащения, в соотношении 1:1, с соблюдением требований асептики).

При анализе на наличие микроаэрофильных бактерий рода *Campylobacter* твердые продукты измельчают в перистальтическом гомогенизаторе или в фарфоровой ступке, избегая активного перемешивания; жидкие продукты перемешивают круговыми движениями, избегая взбалтывания.

8.2.6 Из суспензии или гомогената отбирают необходимое количество пробы продукта в стерильную чашку Петри, в стерильный контейнер с крышкой или на куске стерильного пергамент. Если нормативным документом не предусмотрено иное, для пищевых продуктов и блюд массового потребления масса (объем) продукта для анализа на патогенные микроорганизмы должна составлять не менее $(25 \pm 0,1) \text{ г(см}^3\text{)}$. Масса пробы продуктов детского и диетического питания находится в диапазоне от $(25 \pm 0,1)$ до $(300 \pm 1) \text{ г(см}^3\text{)}$ и определяется действующими гигиеническими нормативами по

нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

Примечание - При отмеривании гомогената продукта учитывают количество добавленной при гомогенизации жидкой обогатительной среды по 8.2.5.

8.2.7 От подготовленной пробы жировых продуктов отбирают не менее 50 г, которые центрифугируют при 10000—20000 * g (12000—16000 об/мин) в течение 1 мин при охлаждении (допускается проводить центрифугирование при температуре не выше 15 °С). Удаляют асептически супернатант и слой жира, анализу подвергают седимент (осадок).

8.2.8 В кислых или кислотосодержащих (с рН < 6,0 ед. рН) жидких пищевых продуктах для предотвращения снижения рН питательных сред на 0,5 ед. рН и более рН перед посевом доводят рН пробы до $(7,0 \pm 0,2)$ ед. рН стерильными растворами гидроокиси натрия и соляной кислоты; в высококислотных продуктах твердых — рН доводят до $(7,0 \pm 0,2)$ ед. рН после посева непосредственно в посевной жидкости. Измерения рН проводят в условиях асептики.

8.2.9 Приготовление объединенной пробы продукта и посев осуществляют в максимально короткие сроки.

Примечание — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А

8.3 Посев в среды обогащения

8.3.1 Подготовленные по 8.2 пробы засевают в жидкие питательные среды и инкубируют для подрачивания находящихся в пищевых продуктах патогенных бактерий и накопления их биомассы.

Материалом для дальнейшего анализа в ПЦР служат пробы культуральной жидкости, представляющей собой биомассу искомым микроорганизмов с совокупностью образованных ими продуктов метаболизма в питательных средах для селективного обогащения, полученную при оптимальных для данных микроорганизмов режимах инкубации.

8.3.2 Первичный посев пищевых продуктов для накопления бактерий рода *Salmonella* проводят в неселективную жидкую среду ЗПВ по 7.1.5, подогретую до (37 ± 1) °С, при соотношении продукта и среды не менее 1:9. Например, пробу массой 25 г засевают в 225 см³ ЗПВ, 50 г — в 450 см³ ЗПВ и т. п. Инкубируют в течение (18 ± 2) ч.

По окончании инкубации в ЗПВ проводят вторичное обогащение параллельно в двух жидких селективных средах: в среде Раппапорта-Вассилиадиса с соей по 7.3.10 и в одной из двух сред — в селенитовом бульоне по 7.3.9 или в МКТ-бульоне по 7.3.11 Для

этого по 1 см³ инокулята из ЗПВ пересевают в 10 см³ каждой из указанных сред. Посевы в RVS-бульоне инкубируют при $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч, в селенитовом бульоне и МКТ-бульоне — при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

Допускается высевать пробы свежих пищевых продуктов, не содержащих сублетально поврежденных бактерий рода *Salmonella* в результате сушки, замораживания, непосредственно в селективные среды, минуя этап неселективного обогащения, при соотношении продукта и среды не менее 1:9, при тех же режимах инкубации.

Для ПЦР-анализа используют культуральную жидкость RVS-бульона и одной из двух сред — селенитового бульона или МКТ-бульона.

8.3.3 Посев пищевых продуктов для накопления бактерий рода *Shigella* проводят непосредственно в среды селективного обогащения — в селенитовый бульон в модификации Лейфсона по 7.3.9 и в бульон для бактерий рода *Shigella* по 7.3.12, используя соотношение 1:9. Посевы инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (18 ± 2) ч. Дальнейшая инкубация может привести к ингибции роста бактерий рода *Shigella*, чувствительных к накоплению кислых продуктов метаболизма.

Для ПЦР-анализа используют культуральную жидкость обеих селективных сред.

8.3.4 Первичный посев пищевых продуктов для неселективного накопления энтерогеморрагических *E. coli*, в том числе серотипа 0157:H7, проводят аналогично посеву на бактерии рода *Salmonella*, при соотношении продукта и среды 1:9, засевая по 25 г пробы в 225 см³ неселективной жидкой среды ЗПВ по 7.1.5, подогретой до $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Инкубируют при этой температуре в течение (18 ± 2) ч.

По окончании инкубации в ЗПВ проводят вторичное обогащение, для чего по 1 см³ инокулята пересевают параллельно в пробирки с 10 см³ жидких селективных сред с лактозой по 7.3.7 и 7.3.8.

Молочные продукты подлежат посеву только в среду Кесслер с лактозой.

Посевы термостатируют при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (22 ± 2) ч.

Допускается высевать пробы пищевых продуктов (мяса и субпродуктов сырые, жира-сырца, крови, сырья кишечного и коллагенсодержащего, молока сырого, цельномолочной продукции, в том числе творога и сыра, плодоовощной продукции), не содержащих сублетально поврежденных энтерогеморрагических *E. coli* в результате сушки или замораживания, непосредственно в селективные среды, минуя этап неселективного обогащения, при соотношении продукта и среды не менее 1:9, при тех же режимах инкубации.

Для ПЦР-анализа используют культуральную жидкость любой из вышеуказанных селективных сред.

С целью подтверждения отсутствия энтерогеморрагических *E. coli* в массе продукта, в которой нормируется отсутствие *E. coli* (продукты и блюда общественного питания, сырокопченые и сыровяленые мясные изделия), посев производят по ГОСТ 30726. При этом подготовленные по 8.2 продукты нормируемой массы или их соответствующие десятичные разведения в ЗПВ засевают непосредственно в пробирки с селективными средами с лактозой по 7.3.7 или 7.3.8. Посевы проверяют на наличие признаков роста через (22 ± 2) ч инкубации при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, отмечая образование кислоты и газа из лактозы (при отсутствии признаков роста инкубируют посевы еще 24 ч), после чего используют для ПЦР-анализа.

8.3.5 Первичный посев пищевых продуктов для детей раннего возраста (молочные смеси и продукты прикорма сухие), а также специализированные продукты для лечебного и профилактического питания детей первого года жизни, подлежащие контролю на наличие *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) согласно (9), проводят в неселективные жидкие среды, исходя из соотношения продукта и среды 1:9.

К пробе массой (300 ± 1) г добавляют $2,7 \text{ дм}^3$ ФБР по 7.1.3 или ЗПВ по 7.1.5, подогретой до $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, термостатируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (18 ± 2) ч.

По истечении инкубации в ФБР или ЗПВ проводят вторичное обогащение, для чего по 10 см^3 суспензии пересевают в 90 см^3 жидких селективных сред для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* — среду Кесслер с глюкозой (см. 7.3.4), или глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью (см. 7.3.5), или бульон Мак-Конки (см. 7.3.6). Посевы термостатируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (22 ± 2) ч.

Для ПЦР-анализа используют культуральную жидкость не менее чем из двух указанных выше питательных сред для селективного обогащения.

8.3.6. Допускается ускоренное определение бактерий рода *Cronobacter* методом ПЦР.

Ускоренное ПЦР-определение бактерий рода *Cronobacter* может быть проведено как после неселективного обогащения в ЗПВ, так и после селективного обогащения в CSB, с использованием диагностических тест-систем (наборов реагентов) для ПЦР выявления ДНК *Cronobacter spp.*

После этапа неселективного обогащения образцов для ускоренного обнаружения бактерий рода *Cronobacter* проводить дальнейшее тестирование с использованием молекулярно-генетических методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР)

После этапа селективного обогащения образцов для ускоренного обнаружения *Cronobacter spp.* проводить дальнейшее тестирование с использованием молекулярно-генетических методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Процедуры выделения ДНК и ПЦР тестирования проводят в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

При ПЦР тестировании объектом детекции является ДНК возбудителя, обнаружение которой не обязательно свидетельствует о присутствии жизнеспособного микроорганизма. При обнаружении бактерий рода *Cronobacter* ускоренным методом с использованием ПЦР необходимо проведение дополнительного бактериологического посева с биохимической идентификацией выделенной культуры для подтверждения жизнеспособности микроорганизма, присутствующего в исследуемом образце.

8.3.7. Посев пищевых продуктов для накопления бактерий рода *Campylobacter* проводят непосредственно в среду селективного обогащения.

К необходимому количеству подготовленной по 8.1.4 и 8.2.5 пробы добавляют девятикратный объем селективного бульона Престона по 7.3.13 или селективного бульона Дойла по 7.3.14. При анализе жировых молочных продуктов седимент, приготовленный согласно 7.2.7, предварительно растворяют в 10 см³ обогащающего бульона и добавляют к остальному объему среды. Полученную взвесь инкубируют в течение 4 ч при 37 °С (а в случае посевов замороженных продуктов или продуктов, которые хранились более 10 дней, — в течение 3 ч при температуре 32 °С и 2 ч при 37 °С). Далее температуру инкубации изменяют, и все посеvy продолжают инкубировать в течение (22 ± 2) ч при (42 ± 1) °С.

Инкубация на всех этапах осуществляется в микроаэрофильных условиях в соответствии с ГОСТ ISO 10272-1.

Для ПЦР-анализа используют культуральную жидкость любой из вышеуказанных селективных сред.

8.3.8 Первичный посев пищевых продуктов для накопления бактерий *L. monocytogenes* проводят в бульон Фрейзера для предварительного селективного обогащения по 7.3.15. Подготовленную пробу массой 25 г(см³) вносят непосредственно в 225 см³ среды, предварительно прогретой в течение 15 мин при температуре 45 °С. Содержимое в колбе встряхивают круговыми движениями руки в радиусе 30 см. При необходимости анализа других масс (объемов) продукта их посев проводят в среду также в соотношении 1:9 по объему в соответствии с ГОСТ 32031.

Посевы термостатируют при (37 ± 1) °С в течение (22 ± 2) ч. В среде предобогащения, содержащей эскулин и цитрат железа аммонийного, отмечают

почернение как признак возможного присутствия бактерий рода *Listeria*, способных к гидролизу гликозида эскулина до глюкозы и эскулетина. Эскулетин реагирует с ионами железа, образуя комплекс черного или оливкового цвета. На среде без эскулина почернения не наблюдается.

После инкубации продукта в среде для первичного обогащения независимо от наличия или отсутствия признаков роста, в том числе почернения, пересевают 1 см³ суспензии в 10 см³ бульона Фрейзера для вторичного селективного обогащения листерий по 7.3.15, предварительно нагретого до температуры 41 °С. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (22 ± 2) ч.

Для ПЦР-анализа используют культуральную жидкость среды (бульонов Фрейзера, UVM, ПБЛ) для вторичного селективного обогащения листерий.

Допускается использовать культуральную жидкость среды (бульонов Фрейзера UVM, ПБЛ) для первичного селективного обогащения листерий при наличии в нем признаков роста (почернение, помутнение) без проведения этапа вторичного обогащения.

8.4 Подготовка проб на средах для первичного обогащения к ПЦР-анализу

8.4.1 Подготовленные по 8.3.2—8.3.7 пробы используют для ПЦР-анализа сразу после окончания инкубации.

8.4.2 Для подтверждения жизнеспособности выявляемых патогенных микроорганизмов параллельно с пробами пищевых продуктов, обогащаемыми в питательных средах, готовят контрольные образцы, не подвергающиеся инкубации (парные образцы). Для этого сразу после инокуляции исследуемого продукта в среду обогащения и тщательного перемешивания отбирают пробы культуральной жидкости, которые замораживают при температуре минус 20 °С и хранят до проведения ПЦР-анализа.

8.4.3 Для подтверждения жизнеспособности выявляемых патогенных микроорганизмов ПЦР-анализу в режиме реального времени подвергают одновременно инокуляты пищевых продуктов в селективных питательных средах после инкубации и не подвергавшиеся инкубации (парные образцы).

8.4.4 Одновременно с ПЦР-анализом проб пищевых продуктов исследуют пробы соответствующих неинокулированных (стерильных) селективных питательных сред, которые используют в качестве отрицательных контрольных образцов.

8.5 Подготовка штаммов бактериальных культур к ПЦР-анализу

8.5.1 При идентификации культур, выделенных из пищевых продуктов, используют изолированные колонии, характерные для патогенных микроорганизмов, указанных в 5.4,

полученные на чашках с селективными агаризованными средами после соответствующего обогащения, в том числе для бактерий:

- рода *Salmonella* — с ксилоза-лизин-дезоксихолатным агаром, висмут-сульфитным агаром, средой Плоскирева, Эндо, Левина, бриллиантовым зеленым агаром;
- рода *Shigella* — средой Плоскирева, дезоксихолат-цитратным агаром с лактозой и сахарозой, сальмонелла-шигелла (SS) агаром;
- рода *Cronobacter* (*E. sakazakii*) — фиолетово-красным желчным агаром с глюкозой (VRBG agar), средой Эндо;
- энтерогеморрагических *E. coli* 0157:H7 и других серотипов (EHEC) — сорбитол *E. coli* 0157:H7 агаром, флуорокульт *E. coli* 0157:H7 агаром, сорбитол Мак-Конки агаром (SMAC), средой Эндо;
- рода *Campylobacter* — селективным агаром Престона, угольным селективным агаром для кампилобактерий, колумбийским агаром;
- вида *L. monocytogenes* — агаром Оттавиани-Агости (ALOA), ПАЛКАМ-агаром (полимиксинакрифлавин-лития хлорид-цефтазидим-эскулин-маннитол агаром), оксфордским агаром, ПАЛ-агаром.

8.5.2 Не менее трех характерных колоний для бактерий родов *Salmonella*, *Shigella*, серотипа *E. coli* 0157:H7. вида *L. monocytogenes* отбирают с одной или нескольких указанных в 8.5.1 селективных сред, производят посев штрихом на поверхность плотных питательных сред МПА или ТСАДЭ по 6.2.3 в отдельных чашках Петри или в пробирки с жидкими средами (МПБ или ТСБДЕ) и инкубируют в течение (22 ± 2) ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Изоляты, предположительно относящиеся к роду *Campylobacter*, засевают на поверхность кровяного колумбийского агара или в бульон для бруцелл и инкубируют при $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24—48 ч в микроаэрофильной атмосфере.

Изоляты, предположительно относящиеся к *Cronobacter* (*E. sakazakii*), пересевают на поверхность ТСАДЭ и термостатируют при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 72 ч.

8.5.3 Для выявления ЕНЕС, фенотипически неотличимых на селективно-дифференциальных средах от других представителей рода *Escherichia*, необходимо увеличить количество тестируемых колоний до десяти, с применением метода пулирования колоний. Для этого используют стерильный иммунологический планшет, в 77 ячеек которого (лунки 1—11, А—Г) вносят по $0,2 \text{ см}^3$ питательного бульона. Крайний правый и нижний ряды лунок оставляют пустыми. Намеченные для исследования колонии петлей снимают и переносят в отдельные лунки планшета, содержащие питательный бульон.

После инкубирования в течение 4—6 ч проводят пулирование образцов. Аликвоты объемом $0,01 \text{ см}^3$ из каждой лунки в ряду переносят в крайнюю пустую лунку (лунка 12). Эту операцию проводят в каждом ряду лунок (А, В, С, D, E, F, G). Аналогично пулируют образцы по каждому столбцу лунок (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 11). Объединенные («стоковые») образцы из крайнего правого и нижнего ряда лунок тестируют методом ПЦР. Лунки, содержащие чистую культуру ЕНЕС, выявляют с учетом пересечения положительных результатов в тестируемых «стоковых» образцах. Выделенные чистые культуры ЕНЕС подвергают дальнейшему анализу.

8.5.4 Бактериальные культуры могут быть представлены для ПЦР-анализа в пробирках на агаризованной среде. В этом случае производят проверку штамма на чистоту путем микроскопирования, пересевают его в пробирки с ТСБДЭ или другими средами, предназначенными для обогащения данного патогена, и инкубируют в течение 24 ч при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

8.5.5 Культуры, полученные по 8.5.2 на плотных питательных средах, смывают с поверхности агара небольшим количеством стерильного физиологического раствора (или снимают петлей) и переносят в стеклянную пробирку. Концентрацию бактериальных клеток в суспензии проверяют по оптическому стандарту МакФарланда. Плотность суспензии должна составлять не менее 1,5—2,0 ед. по шкале МакФарланда. При использовании отраслевого стандарта для визуальной оценки мутности № 10 концентрация клеток в пробе должна составлять не менее 10^7 кл/см^3 .

Аналогичным образом устанавливают плотность культур на жидких средах. Содержимое пробирки тщательно перемешивают на встряхивателе типа «вортекс» для получения гомогенной суспензии.

Для ПЦР-анализа используют полученные суспензии микроорганизмов или бульонные культуры, содержащие не менее 10^7 клеток/см^3 , которые подвергают дальнейшим манипуляциям для выделения ДНК. Подготовленные пробы анализируют в тот же день.

8.6 Подготовка проб нативных пищевых продуктов к ПЦР-анализу

8.6.1 Пробы пищевых продуктов, предназначенные для анализа в нативном виде при расследовании вспышек пищевых бактериальных отравлений и инфекций с пищевым путем передачи, подлежат первичной обработке в зависимости от консистенции: путем концентрирования (для жидких продуктов) или перевода в жидкую фазу с последующим концентрированием (для сухих или твердых продуктов).

8.6.2 Концентрирование проб жидкой консистенции объемом до 50 см^3 путем центрифугирования проводят в условиях асептики по одному из двух режимов:

- одномоментно при 6000 об/мин в течение (18 ± 2) мин;
- дробно при 1000 об/мин в течение 5 мин для осаждения крупных частиц и при 6000 об/мин в течение 15 мин.

По окончании центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 5 см^3 0,9%-ного фосфатного буферного раствора NaCl по 7.1.4 и ресуспендируют.

Для экстракции ДНК отбирают 1 см^3 взвеси в пробирку типа эппендорф вместимостью $1,5 \text{ см}^3$; оставшаяся часть подготовленной пробы используется для посева на питательные среды.

8.6.3 Концентрирование проб жидкой консистенции объемом до 50 см^3 путем мембранной фильтрации проводят в два этапа:

- 1) с использованием стерилизованных ватно-марлевых или бумажных фильтров для освобождения от крупных частиц во избежание засорения мембранных фильтров;
- 2) через мембранные фильтры № 3 с величиной пор 600—800 нм.

Для фильтрования через мембранные фильтры используют предварительно простерилизованные фильтровальные аппараты (системы), подключенные к вакуумному насосу, или фильтрующие насадки на шприц соответствующей вместимости.

Перед началом фильтрования мембранные стерильные фильтры с соблюдением правил асептики закрепляют в аппарате матовой стороной вверх. Фильтрование проводят дробно, пропуская через каждый фильтр не более 25 см^3 жидкости, подвергнутой на первом этапе фильтрации через ватно-марлевый или бумажный фильтр.

После окончания фильтрации фильтрат удаляют, а все использованные фильтры переносят в стерильную чашку Петри, измельчают стерильными ножницами и заливают $5\text{—}6 \text{ см}^3$ стерильного изотонического раствора натрия хлористого для десорбции бактерий.

Из полученного смыва отбирают 1 см^3 в пробирку типа эппендорф вместимостью $1,5 \text{ см}^3$ для экстракции ДНК, оставшаяся часть подготовленной пробы используется для посева на питательные среды.

8.6.4 Пробы пищевых продуктов твердой консистенции и сухих массой 25—50 г в условиях асептики предварительно измельчают ножницами, растирают в фарфоровой ступке или в гомогенизаторе при добавлении ФБР по 7.1.3 или стерильной деионизированной воды в соотношении 1:5 или 1:10 для получения 10—20 % концентрации продукта. Смесь доводят до гомогенного состояния.

Полученную суспензию отстаивают 3—10 мин для осаждения грубых частиц, жидкую фазу центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин.

Если полученный осадок вязкий, из него отбирают 1 см³ для экстракции ДНК в пробирку типа эппендорф емкостью 1,5 см³ и не менее 2 см³ — для посева на питательные среды; если плотный — предварительно ресуспендируют в 0,2—0,5 см³ стерильной деионизированной воды.

8.6.5 Подготовленные по 8.6.2—8.6.4 пробы хранению не подлежат и используются для экстракции ДНК сразу после окончания пробоподготовки.

9. Выделение ДНК из анализируемого материала (экстракция ДНК из анализируемых проб)

9.1 Экстракция ДНК из каждой анализируемой пробы проводится в присутствии ВКО, для контроля правильности (точности) этапов выделения и амплификации ДНК.

9.2 В качестве отрицательного контроля (ОК) этапа экстракции ДНК из культуральной жидкости используют стерильный образец питательной среды для обогащения анализируемого продукта, предварительно протестированный на отсутствие ДНК искомым патогенным бактериям; из проб нативных продуктов — стерильный изотонический раствор натрия хлористого или ФБР для десорбции бактерий. При наличии спорных или невалидных результатов ПЦР используют ОК этапа выделения из набора реагентов.

9.3 Для экстракции ДНК применяют коммерчески доступные комплекты реагентов на основе методов сорбции ДНК на силикагеле или преципитации ДНК в соответствии с инструкцией производителя при возможности их сочетания с комплектами реагентов для амплификационного этапа исследований. Экстракцию ДНК из культуральной жидкости, взвесей микроорганизмов и бульонных культур, подготовленных по 8.3. 8.4 и 8.5, проводят без дополнительной обработки.

Использование роботизированных систем для экстракции нуклеиновых кислот допускается при наличии указаний в инструкции к прилагаемым комплектам реагентов на возможность их применения при анализе пищевой продукции.

Не допускается применение упрощенных методик экстракции ДНК на основе термокоагуляции.

9.4 Допускается проводить экстракцию ДНК из проб нативных пищевых продуктов по 9.3. При повышенном содержании жиров перед экстракцией ДНК проводят дополнительную обработку пробы суспензией неполярных растворителей с водой для перевода содержащейся в пищевом продукте ДНК в водную фазу, в которой и производится дальнейшая очистка.

10 Проведение ПЦР-анализа

10.1 ПЦР для выявления ДНК патогенных бактерий (родов *Salmonella*, *Shigella*, *Cronobacter* (*E. sakazakii*), энтерогеморрагических *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*) осуществляется с использованием программируемого амплификатора и наборов реагентов по 5.3.1, обеспечивающих постановку любого их двух вариантов гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации — по конечной точке (FEP) и в режиме реального времени (FR7).

10.2 Постановку ПЦР для выявления ДНК бактерий родов *Salmonella*, *Shigella*, *Cronobacter* (*E. sakazakii*), энтерогеморрагических *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter spp.* осуществляют по схемам и алгоритмам, рекомендованным производителем комплектов реагентов с обязательным применением внутренних контрольных образцов с этапа экстракции ДНК.

10.3 Положительные результаты тестирования отрицательного контроля экстракции ДНК (стерильный образец питательной среды для селективного обогащения) могут быть связаны с загрязнением среды генетическим материалом тестируемого микроорганизма. В этом случае необходимо повторить анализ с этапа селективного обогащения с применением сред, не содержащих ДНК искомого микроорганизма, с дополнительным включением в панель в качестве отрицательного контроля выделения препарата ОКО из набора реагентов.

11 Оценка жизнеспособности патогенных микроорганизмов в анализируемых пищевых продуктах

11.1 При положительных результатах ПЦР-анализа проб нативных пищевых продуктов или культуральной жидкости, свидетельствующих об обнаружении ДНК искомым патогенных бактерий, необходимо подтвердить наличие в пробе жизнеспособных микроорганизмов — одновременно с выполнением анализа методом ПЦР-FRT или методом культурального посева.

11.2 Для оценки жизнеспособности целевого микроорганизма в ходе ПЦР-анализа сопоставляют результаты одновременного тестирования методом ПЦР-FRT парных образцов одного и того же продукта, подвергавшихся и не подвергавшихся инкубации после посева на этапе пробоподготовки по 8.4.2. Для оценки жизнеспособности микроорганизмов может применяться только ПЦР-FRT.

Результаты ПЦР, регистрируемые в процессе реального времени и показывающие различия в значениях C_1 (пороговых циклов амплификации) для парных образцов на три

единицы и более ($Ct^{\wedge}$ инк — $Ct_{\text{МНК}} S 3$, $Ct_{\text{не инк}}$ — цикл амплификации не инкубированного образца, $Ct^{\wedge}$ — цикл инкубированного образца), свидетельствуют о наличии в продукте живых (неинактивированных) клеток микроорганизма.

Интерпретацию результатов проводят согласно таблице 1.

Таблица 1

Результат ПЦР-анализа инкубированного образца	Результат ПЦР-анализа замороженного образца	Интерпретация результатов
Положительный	Положительный	Жизнеспособный возбудитель
Положительный	Отрицательный	Жизнеспособный возбудитель
Отрицательный	Положительный	Нежизнеспособный возбудитель
Отрицательный	Отрицательный	Возбудитель не выявлен

11.3 Для оценки жизнеспособности целевого микроорганизма допускается выделение чистой культуры искомого патогена (о присутствии которого в пробе свидетельствуют положительные результаты ПЦР-FER или ПЦР-FRT) из анализируемого материала культуральным методом.

При исследовании проб обогащенных пищевых продуктов в селективных питательных средах по 8.4.1 проводят прямой посев в количестве $0,1 \text{ см}^3$ на поверхность соответствующих агаризованных селективно-дифференциальных сред, используемых для выделения патогенных бактерий, указанных в 8.5.1, используют не менее двух сред.

При исследовании проб нативных пищевых продуктов, отобранных при расследовании вспышек по 8.6, одновременно проводят:

а) прямой посев на поверхность соответствующих агаризованных селективно-дифференциальных сред по 8.3.2;

б) посев по $0,1—1,0 \text{ см}^3$ в 10 см^3 соответствующих жидких питательных сред для селективного обогащения по 8.3.2—8.3.7. После инкубирования сред производят пересев на поверхность агаризованных селективно-дифференциальных сред по 8.5.1.

На данном этапе допускается проведение посева методом парных проб по 8.4.2 с приготовлением контрольного образца, подвергающегося замораживанию при минус 20°C и не подлежащего инкубации.

11.4 Посевы на агаризованных средах начинают просматривать через 16—18 ч, затем через 24 ч и 48 ч. При обнаружении роста характерных колоний (или газона культуры) их обрабатывают по 8.5 и анализируют путем постановки ПЦР по разделу 8 или методами традиционного биохимического и серологического типирования по ГОСТ ISO 10272-1, ГОСТ 31659, ГОСТ 32010, ГОСТ 32031, на принадлежность к родам, видам, серотипам искомым патогенным бактериям.

Для подтверждения принадлежности культур к искомым патогенным бактериям могут применяться мультимикротесты для биохимической идентификации по 5.3.2.

11.5 При анализе бактериальных культур по 8.5 подтверждение жизнеспособности не требуется.

12 Учет и интерпретация результатов

12.1 Результаты оценивают по каждой анализируемой пробе отдельно.

12.2 Заключение о присутствии искомых патогенных бактерий в нормируемой массе (объеме) продукта выдают при получении положительного результата ПЦР (выявлении ДНК указанных микроорганизмов в пробе) и подтверждении их жизнеспособности.

12.3 Заключение об отсутствии искомых патогенных бактерий в исследованной массе (объеме) продукта выдают при получении отрицательного результата ПЦР (невыявлении ДНК искомых микроорганизмов) при анализе проб пищевых продуктов, подвергнутых инкубации в питательных средах, или положительного результата ПЦР (выявлении ДНК искомых микроорганизмов в пробе), но отрицательного результата по подтверждению жизнеспособности.

12.4 Заключение об отсутствии искомых патогенных бактерий в нативном продукте, исследуемом при расследовании вспышек, при получении отрицательного результата ПЦР (невыявлении ДНК искомых микроорганизмов) не выдают.

12.5 Заключение о принадлежности бактериальных чистых культур к искомым патогенным бактериям выдают при получении положительного результата ПЦР (выявлении ДНК указанных микроорганизмов в пробе).

12.6. Учет результатов ускоренного обнаружения бактерий рода *Cronobacter* методом ПЦР.

При получении отрицательного результата ПЦР-тестирования делают заключение об отсутствии бактерий рода *Cronobacter* в исследованной навеске (объеме) продукта или образце окружающей среды из зоны производства и переработки пищевых продуктов.

При получении положительного результата ПЦР-тестирования делают заключение об обнаружении бактерий рода *Cronobacter* в исследованном образце только при получении подтверждения жизнеспособности микроорганизма путем проведения исследования бактериологическим методом.

Приложение А

(справочное)

Информация о применяемых нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ

А.1 Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ приведена в таблице А.1.

Таблица А.1

Структурный элемент	Наименование технического регламента или нормативного правового акта	Государство-участник СНГ
Раздел 3	Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011	AM, BY, KZ, KG, RU
	Закон РУз «О качестве и безопасности пищевой продукции»	UZ
	Технический регламент «Безопасность пищевой продукции»	TD
Раздел 3	Технический регламент Таможенного союза «О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции, в том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания» ТР ТС 027/2012	AM, BY, KZ, KG, RU

Приложение Б (справочное)

Приготовление посуды и материалов, растворов, реактивов и питательных сред для предварительного и селективного обогащения микроорганизмов

Б.1. Подготовка посуды и материалов

Вымытую посуду стерилизуют в сушильном шкафу при $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 2 ч или в паровом стерилизаторе (автоклаве) при $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (30 ± 1) мин с последующим подсушиванием в стерилизационном сушильном шкафу.

Чашки Петри и пипетки стерилизуют завернутыми в плотную оберточную бумагу или в пеналах. В верхнюю часть пипетки предварительно вкладывают кусочек ваты.

Пробирки, флаконы, бутылки, колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный колпачок, который обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым колечком.

Каучуковые, корковые и стеклянные пробки стерилизуют в автоклаве, упакованными в бумагу.

Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками. Срок хранения стерильной посуды — не более 30 сут. при ненарушенной упаковке или в невскрытых пеналах.

Допускается использование одноразовой стерильной пластиковой посуды при соблюдении сроков годности, указанных на упаковке.

Перед применением одноразовых наконечников с фильтром для дозаторов и чашек Петри одноразовых необходимо проверить герметичность их упаковки

Б.2. Приготовление растворов, реактивов и питательных сред.

Б.2.1. Для приготовления растворов, реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду.

Стерильная дистиллированная вода. Дистиллированную воду разливают в колбы или пробирки в необходимых количествах и стерилизуют в течение (20 ± 1) мин при $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Б.2.2 Изотонический 0,85%-ный водный раствор хлорида натрия готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1.

Б.2.3. Растворы и реактивы для окраски микроскопических препаратов по Граму, растворы красителей (кристаллического фиолетового, генцианвиолета, сафранина, бриллиантового зеленого, бром-крезолового пурпурного и др.), растворы гидроокиси натрия и соляной кислоты для нейтрализации высококислотных продуктов готовят в

соответствии ГОСТ 10444.1 или по прописям, указанным на этикетках соответствующих препаратов промышленного производства.

Б.2.4. Фосфатно-буферный раствор (ФБР)

Приготовление концентрированного раствора: $(34 \pm 0,4)$ г однозамещенного фосфорнокислого калия растворяют в $500,0—700,0 \text{ см}^3$ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 по ГОСТ 1770. Активную кислотность раствора $(7,2 \pm 0,1)$ ед. pH устанавливают добавлением 1 Н раствора гидроксида натрия и доводят дистиллированной водой до $1000,0 \text{ см}^3$. Полученный раствор хранят в емкости, закупоренной резиновой пробкой, в условиях холодильника не более 30 сут.

Приготовление разбавленного раствора: $1,25 \text{ см}^3$ концентрированного раствора вносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 по ГОСТ 1770 и доводят объем дистиллированной водой до метки, проверяют активную кислотность, которая должна составлять $(7,1 \pm 0,1)$ ед. pH.

ФБР разливают по $9,0 \text{ см}^3$ в пробирки, по $90,0 \text{ см}^3$ в колбы вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 1770 и по $900,0 \text{ см}^3$ в колбы вместимостью 2000 см^3 по ГОСТ 1770, закрывают ватными пробками. Стерилизуют в автоклаве при $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 1) мин.

При добавлении к 1 дм^3 ФБР-хлористого натрия в количестве 9 г до стерилизации получают фосфатный буферный 0,9%-ный раствор NaCl.

Б.2.5. Забуференная пептонная вода (ЗПВ) готовят по ГОСТ 31659.

Б.2.6. Аэротолерантная добавка для кампилобактерий

Аэротолерантную добавку для селективных бульонов Престона и Дойла готовят по следующей прописи:

натрий пировинограднокислый — 6,25 г;

железо (II) сернокислое — 6,25 г;

натрий метабисульфит — 6,25 г;

стерильная дистиллированная вода — 100 см^3 .

Натрий пировинограднокислый растворяют в $10—20 \text{ см}^3$ стерильной дистиллированной воды, добавляют железо (II) сернокислое и натрия метабисульфит, доводят объем раствора до 100 см^3 . Разливают в пробирки по 4 см^3 . Хранят в защищенном от света месте при температуре минус $20 ^\circ\text{C}$ не более 1 мес. Раствор чрезвычайно чувствителен к воздействию света, после его добавления к питательным средам их необходимо сохранять в защищенном от света месте.

Б.3. Приготовление питательных сред

Приготовление и контроль качества питательных сред осуществляют в соответствии с ГОСТ ISO 11133 согласно прописям, указанным на этикетках или в инструкциях изготовителя.

Б.3.1 Питательный агар с 1 % глюкозы и питательный бульон с 1 % глюкозы (мясо-пептонный агар (МПА) с 1 % глюкозы, МПБ с 1 % глюкозы) готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1.

Б.3.2. Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (ТСБДЭ) и триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (ТСАДЭ) готовят в соответствии со следующей прописью (г/дм³): ферментативный гидролизат казеина - 17,0 г; пептон соевый — 3,0; натрий хлористый — 5,0; фосфат калия однозамещенный — 2,5; D-глюкоза — 2,5; дрожжевой экстракт — 6,0; агар микробиологический (для ТСАДЭ) — 15,0.

Компоненты растворяют в 1000 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают рН ($7,3 \pm 0,2$) ед. рН и автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин. Готовые среды разливают в стерильные колбы или пробирки и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С.

Б.3.3. Среду Кесслер с глюкозой готовят в соответствии со следующей прописью:

пептон мясной ферментативный — 10 г;

O-глюкоза — 2,5 г;

желчь крупного рогатого скота сухая — 5 г (натуральная 50 см³);

1 %-ный водный раствор кристаллического фиолетового (генцианвиолета) — 2 см³;

дистиллированная вода — 1000 см³.

Компоненты растворяют в 900 см³ дистиллированной воды, нагревают на слабом огне до кипения. кипятят 1—2 мин. доводят объем до 1 дм³, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45—55 °С. рН среды устанавливают таким образом, чтобы после стерилизации он составлял ($7,3 \pm 0,2$) при температуре 25 °С. Разливают в пробирки с поплавками по 10 см³, автоклавируют при ($114 \pm 1,0$) °С в течение 20 мин.

Б.3.5 Глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью готовят в соответствии со следующей прописью:

пептон мясной ферментативный — 10 г;

D-глюкоза — 5 г;

натрий фосфорнокислый двухзамещенный безводный — 6,45 г;

калий фосфорнокислый однозамещенный безводный — 2 г;

желчь крупного рогатого скота сухая — 20 г (натуральная 200 см³);

0,5%-ный водный раствор бриллиантового зеленого — 3 см³;

дистиллированная вода — до 1000 см³.

Компоненты растворяют в 900 см³ дистиллированной воды, нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1—2 мин, доводят объем до 1 дм³, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45—55 °С. рН устанавливают таким образом, чтобы он составлял $(7,2 \pm 0,1)$ ед. рН при температуре 25 °С. после чего повторно доводят до кипения. Разливают в стерильные пробирки с поплавками по 10 см³.

Б.3.6. Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью

Жидкую селективную обогатительную среду бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью готовят по ГОСТ 31747. Дополнительно в случае использования среды двойной концентрации для посева образцов, масса (объем) которых превышает 10 г(см³). допускается разливать среду в колбы или флаконы соответствующей вместимости, содержащие пробирки Дархама (поплавки), по 100 см³

Б.3.7. Бульон селективный с лаурилсульфатом (натрия додецилсульфатом)

К 1.0 дм³ водопроводной воды добавляют 20 г триптозы (ферментативного перевара казеина и животных белков), 5 г лактозы, по 2,75 г калия гидрофосфата и дигидрофосфата. 5 г хлористого натрия. 0,1 г натрия додецилсульфата (лаурил сульфата), растворяют, нагревая на водяной бане при помешивании 2 -3 мин. При необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, после чего доводят объем водой до 1 дм³. Устанавливают рН $(6,8 \pm 0,2)$ ед. при 25 °С. При необходимости приготовления среды двойной концентрации количество всех ингредиентов, кроме воды, удваивают. Разливают по 10 см³ в пробирки размером 16 x 160 мм, содержащие пробирки Дархама (в случае использования среды нормальной концентрации), или в пробирки размером 20 x 200 мм или колбочки вместимостью 50 см³, содержащие пробирки Дархама (поплавки) (в случае использования среды двойной концентрации).

Стерилизуют среду в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 10 мин. Пробирки Дархама не должны содержать воздушные пузырьки после стерилизации.

Б.3.8. Сухие среды бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью, среду Кесслер, бульон селективный с лаурилсульфатом, ЕС-бульон промышленного производства подготавливают для посева согласно прописи на этикетке.

Б.3.9. Бульон Мак-Конки с глюкозой готовят в соответствии с ГОСТ 31747

Б.3.10. Среда Кесслер с лактозой готовят в соответствии с ГОСТ 31747

Б.3.11. Лактозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью готовят в соответствии с ГОСТ 31747

Б.3.12 Среда обогатительную селективную — бульон для бактерий рода *Shigella* готовят в соответствии с ГОСТ 32010

Б.3.13. Среду жидкую обогатительную среда для кампилобактерий – бульон Болтона готовят по ГОСТ ISO 10272-1

Б.3.14. Селективный бульон Престона для накопления кампилобактерий готовят в соответствии со следующей прописью:

Основы среды: пептон мясной ферментативный — 10 г; мясной экстракт — 10 г;
натрий хлористый — 5 г; вода — 920 см³.

Компоненты среды растворяют в дистиллированной воде. При наличии нерастворившегося осадка раствор подогревают до кипения для полного растворения частиц. pH раствора доводят до величины $(7,5 \pm 0,2)$ ед. pH с помощью 0,1 М раствора HCl или 0,1 М раствора NaOH. Стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °C в течение 15 мин. Остужают до 45—50 °C.

Готовая среда - перед использованием в 920 см³ бульона асептически добавляют: 70 см³ стерильной дефибринированной крови барана, растворенное в 50%-ном растворе ацетона содержимое двух флакончиков с добавкой антибиотиков для кампилобактерий IV (по Престону) и растворенное в стерильной дистиллированной воде содержимое двух флакончиков ростовой добавки для кампилобактерий или 4 см³ аэротолерантной добавки по 7.1.6, тщательно перемешивают и разливают среду по 90,0 см³ в колбы или флаконы вместимостью 250 см³ или по 9,0 см³ в пробирки.

Б.3.15. Селективный бульон Дойла для накопления кампилобактерий готовят в соответствии со следующей прописью:

Основы среды:

ферментативный гидролизат казеина — 10 г;

пептон мясной ферментативный — 10 г;

дрожжевой экстракт — 2 г;

D-глюкоза — 1 г;

натрий хлористый — 5 г;

натрия гидросульфит — 0,1 г;

натрия сукцинат — 3 г;

L-цистеина гидрохлорид — 0,1 г;

дистиллированная вода — 920 см³.

Растворяют компоненты среды в дистиллированной воде (при использовании готовой основы указанного состава промышленного изготовления количество согласно прописи на этикетке). При наличии нерастворившегося осадка подогревают до кипения для полного растворения частиц. Устанавливают pH = $(7,0 \pm 0,2)$ ед. pH при 25 °C.

Стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Остужают до температуры 45 °С.

Готовая среда - перед использованием в 460 см³ основы асептически добавляют 35 см³ стерильной дефибринированной крови барана, а также растворенное в 5 см³ 50%-ного раствора этанола содержимое одного флакончика с добавкой антибиотиков модифицированной III (по Дойлу). Тщательно перемешивают и разливают по 90,0 см³ в колбы или флаконы вместимостью 250 см³ или по 9 см³ в пробирки.

Б.3.16. Среду Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) — основную среду для селективного обогащения сальмонелл готовят по ГОСТ 31659. Среду RVS-бульон сухую промышленного изготовления готовят согласно прописи на этикетке.

Б.3.17. Модифицированный полужидкий селективный агар Раппопорта-Василиадиса (MSRV) готовят по ГОСТ 31659

Б.3.18. Бульон Мюллера-Кауфмана тетрационатно-новобиоциновый бульон (МКТТн-бульон) - дополнительную среду для селективного обогащения сальмонелл готовят по ГОСТ 31659.

Б.3.19. Бульон Фрейзера.

Бульон Фрейзера полуконцентрированный для предварительного селективного обогащения и бульон Фрейзера для селективного (вторичного) обогащения с полной концентрацией селективных компонентов готовят в соответствии с ГОСТ 32031

Готовые среды разливают в стерильные колбы: полуконцентрированный бульон Фрейзера — в объемах, в 9 раз превышающих массу (объем) засеваемого продукта; бульон Фрейзера с полной концентрацией селективных компонентов — по 90 см³, и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 6°С не более трех недель.

Б.3.20. Селективный накопительный бульон (UVM) для выделения и культивирования листерий для первичного селективного обогащения и селективный накопительный бульон (UVM II) для вторичного селективного обогащения листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

Б.3.21. Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I) для первичного селективного обогащения и питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II) для вторичного селективного обогащения листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

Б.3.22. *Cronobacter* селективный бульон готовят в соответствии с ГОСТ ISO 22964.

УДК 579.672:637.065:006.354

МКС 67.050

Ключевые слова: специализированная пищевая продукция, патогенные микроорганизмы, полимеразная цепная реакция, экстракция ДНК, тестирование

Сведения о разработчике:

Разработчик межгосударственного стандарта:

- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14, тел. +7 (495) 698-53-30, e-mail: mailbox@ion.ru, tashenka13@inbox.ru.

Руководитель организации – разработчика:

Директор ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», академик РАН, профессор, д.м.н.

Д.Б. Никитюк

(подпись)

Руководители разработки:

Заместитель Директора ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», д.б.н.

Н.Р. Ефимочкина

(подпись)

Заведующая лабораторией биобезопасности и анализа нутримикробиома, д.м.н.

С.А. Шевелева

(подпись)

Заведующая лабораторией витаминов и минеральных веществ, к.б.н.

Н.В. Жилинская

(подпись)

Исполнители:

Старший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома, к.б.н.

Ю.М. Маркова

(подпись)

Научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома

И.Б. Быкова

(подпись)

Научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома

В.В. Стеценко

(подпись)

Младший научный сотрудник лаборатории
биобезопасности и анализа
нутримикробиома

Ю.В. Смотрина

(подпись)

Младший научный сотрудник лаборатории
биобезопасности и анализа
нутримикробиома

А.С. Полянина

(подпись)

УДК 579.672:637.065:006.354

МКС 67.050

Ключевые слова: специализированная пищевая продукция, патогенные микроорганизмы, полимеразная цепная реакция, экстракция ДНК, тестирование

Сведения о разработчике:

Разработчик межгосударственного стандарта:

- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14, тел. +7 (495) 698-53-30, e-mail: mailbox@ion.ru, tashenka13@inbox.ru.

Руководитель организации – разработчик:

Директор ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», академик РАН, профессор, д.м.н.



(подпись)

Д.Б. Никитюк

Руководители разработки:

Заместитель Директора ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», д.б.н.

(подпись)

Н.Р. Ефимочкина

Заведующая лабораторией биобезопасности и анализа нутримикробиома, д.м.н.

(подпись)

С.А. Шевелева

Заведующая лабораторией витаминов и минеральных веществ, к.б.н.

(подпись)

Н.В. Жилинская

Исполнители:

Старший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома, к.б.н.

(подпись)

Ю.М. Маркова

Научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома

(подпись)

И.Б. Быкова

Научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома

(подпись)

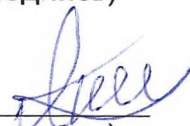
В.В. Стеценко

Младший научный сотрудник лаборатории
биобезопасности и анализа
нутримикробиома


(подпись)

Ю.В. Смотрина

Младший научный сотрудник лаборатории
биобезопасности и анализа
нутримикробиома


(подпись)

А.С. Полянина