ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57481— 2017

ПРОДУКТЫ УБОЯ ПТИЦЫ, ПРОДУКЦИЯ ИЗ МЯСА ПТИЦЫ И ОБЪЕКТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Обнаружение патогенных микроорганизмов (Salmonella spp., L.monocytogenes) методом молекулярного анализа

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом птицеперерабатывающей промышленности — филиалом Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (ВНИИПП)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 116 «Продукты переработки птицы, яиц и сублимационной сушки»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 31 мая 2017 г. № 468-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Август 2018 г.

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2018

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ УБОЯ ПТИЦЫ, ПРОДУКЦИЯ ИЗ МЯСА ПТИЦЫ И ОБЪЕКТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Обнаружение патогенных микроорганизмов (Salmonella spp., L.monocytogenes) методом молекулярного анализа

Poultry slaughtering products, poultry meat products and environmental production objects. Pathogen microorganisms identification (Salmonella spp., L.monocytogenes) by molecular analysis method

Дата введения — 2018—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется:

- на продукты убоя птицы (тушки, части тушек, жир-сырец, кожу, субпродукты, мясо птицы механической обвалки, кость птицы пищевую, сырье коллагенсодержащее), полуфабрикаты из мяса птицы, в т. ч. высокой степени готовности, и яичные продукты, предназначенные для пищевых целей (далее — продукт);
- продукцию из мяса птицы и яиц сельскохозяйственной птицы, готовую к употреблению — колбасные, кулинарные изделия, консервы и др. (далее — готовые продукты);
- объекты окружающей производственной среды (технологическое оборудование, тара, инвентарь, стены и полы производственных цехов, воздух в производственных цехах, одежда и поверхность рук работников).

Настоящий стандарт устанавливает молекулярный метод качественного обнаружения патогенных бактерий родов Salmonella spp. и L.monocytogenes на основе технологии петлевой изотермической амплификации ДНК (*LAMP*) и биолюминесцентной детекции.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

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

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

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

ГОСТ 8756.0 Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию

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

Издание официальное

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

ГОСТ 27987 Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31468 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Метод выявления сальмонелл

ГОСТ 31659 (ISO 6579:2002) Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella

ГОСТ 32031 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий Listeria monocytogenes

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

ГОСТ Р 52313 Птицеперерабатывающая промышленность. Продукты пищевые. Термины и определения

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 52313, ГОСТ 7702.2.0, ГОСТ 31468, ГОСТ 32031.

4 Сущность метода

Технология петлевой изотермической амплификации ДНК (*LAMP*) использует несколько праймеров, которые распознают различные участки гена-мишени бактерий рода Salmonella spp. и L.monocytogenes. Целевая ДНК непрерывно амплифицируется, при этом процесс является высокоспецифичным и быстрым и приводит к появлению более 10^9 копий ДНК всего за 15 мин. Биолюминесценция применяется для отображения амплификации ДНК патогенных бактерий в режиме реального времени. Она включает в себя двухэтапный ферментативный процесс, в котором молекулы пирофосфата, являющиеся побочным продуктом амплификации ДНК, используются для генерации света. Это свечение затем считывается прибором. Положительные результаты отображаются в режиме реального времени, тогда как отрицательные результаты отображаются по окончании анализа.

Этап предварительного обогащения анализируемых проб является обязательным этапом анализа, обеспечивающим биологическое накопление возбудителей.

5 Требования безопасности

5.1 Общие требования проведения микробиологических исследований — по ГОСТ ISO 7218, в том числе требования безопасности к работе с микроорганизмами III и IV групп патогенности — по [1], [2].

5.2 При подготовке и проведении анализа необходимо соблюдать требования безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

5.3 Помещение, в котором проводят анализ, должно быть оснащено приточно-вытяжной вентиляцией. 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.

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

5.5 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218.

6 Аппаратура, оборудование, материалы и реактивы

6.1 Аппаратура, оборудование и материалы — по ГОСТ 7702.2.0 со следующими дополнениями:

- анализатор потенциометрический с погрешностью измерения pH ±0,01 ед. pH по ГОСТ 27987;
- компьютер, совместимый с программным обеспечением прибора для молекулярного анализа;
- система молекулярного анализа в комплекте:
  1) прибор для молекулярного анализа (амплификатор),
  2) программное обеспечение (ПО),
  3) нагревательный блок,
  4) охладительный блок,
  5) инструмент для запечатывания и распечатывания лизис-пробирок,
  6) инструмент для запечатывания и распечатывания реагент-пробирок,
  7) штатив для лизис-пробирок,
  8) штатив для реагент-пробирок;
- микродозаторы (одноканальные или 8-канальные) пипеточные номинальной вместимостью 20, 50 мм^3 с относительной погрешностью дозирования не более ±1 % с соответствующим наконечником по ГОСТ 28311;
- наконечники для микродозаторов с фильтрами 0,5—50 мм^3;
- пакеты для гомогенизации образцов с фильтром;
- колбы по ГОСТ 25336;
- термостаты электрические для выращивания микроорганизмов с автоматическим терморегулятором, обеспечивающим поддержание температуры от 20 °С до 55 °С по ГОСТ ISO 7218;
- весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности и пределами допускаемой абсолютной погрешности ±0,001 г;
- баня водяная, поддерживающая температуру до 100 °С по ГОСТ ISO 7218;
- термостат твердотельный блочный с автоматическим терморегулятором и таймером, обеспечивающий поддержание температуры до (100 ± 1) °С;
- тест-наборы для обнаружения патогенных бактерий родов Salmonella spp. и L.monocytogenes по документации изготовителя, содержащие:
  1) лизис-пробирки с 580 мм^3 раствора для лизиса в каждой пробирке — 96 шт. (12 стрипов по 8 пробирок),
  2) реагент-пробирки с лиофилизированной смесью для амплификации — 96 шт. (12 стрипов по 8 пробирок),
  3) запасные колпачки для реагент-пробирок — 96 шт.,
  4) пробирки для контроля реагентов с лиофилизированой смесью для амплификации и контрольной ДНК — 16 шт.

6.2 Допускается применение других аппаратуры и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

7 Подготовка к проведению анализа

7.1 Отбор и подготовка проб — по ГОСТ 7702.2.0, ГОСТ 9792, ГОСТ 8756.0

Для отбора проб окружающей среды используют губку (спонж) или тампон с нейтрализующим раствором, не содержащие антимикробные вещества.

Размер участка пробы для проверки присутствия или отсутствия патогенов на поверхности составляет 100 см^2 (10 × 10 см). Забирая пробу с помощью губки, покрывают весь участок в двух направлениях (слева направо, затем сверху вниз).

7.2 Подготовка посуды — по ГОСТ 31468.

7.3 Подготовка комплектующих изделий системы молекулярного анализа

7.3.1 Подготовка охладительного блока

Перед применением охладительного блока необходимо убедиться в том, что он хранился при комнатной температуре от 15 °С до 25 °С.

7.3.2 Подготовка нагревательного блока

Нагревательный блок помещают в твердотельный блочный термостат и задают температуру (100 ± 1) °С, которая достигается в течение 30—50 мин.

7.3.3 Подготовка прибора для молекулярного анализа

Запускают программное обеспечение для молекулярного анализа. Включают прибор для молекулярного анализа. Вносят данные для каждой пробы (дату анализа, наименование и код образца).

Прибор должен достичь температуры 60 °С и поддерживать ее. Нагревание прибора длится около 20 мин и фиксируется световым сигналом оранжевого цвета, при достижении температуры — зеленым. Затем в прибор загружают штатив с реагент-пробирками.

7.4 Питательные среды

Среды для предварительного обогащения:

- Salmonella spp. — забуференная пептонная вода по ГОСТ 7702.2.0;
- L.monocytogenes — бульон Фразера полуконцентрированный по ГОСТ 32031.

8 Проведение анализа

8.1 Предварительное обогащение пробы

Цель — увеличение количества клеток патогенных бактерий.

Среды для предварительного обогащения (забуференная пептонная вода и бульон Фразера полуконцентрированный) подогревают до температуры (37,0 ± 1,0) °С или (41,5 ± 1,0) °С в зависимости от группы продуктов (готовые или сырые либо пробы, отобранные из окружающей производственной среды) согласно таблицам 1 и 2.

В асептических условиях в каждый пакет с фильтром или колбу помещают необходимое количество среды для предварительного обогащения и количество пробы продукции или пробы из окружающей среды согласно таблицам 1 и 2.

Затем тщательно перемешивают содержимое пакета или колбы в течение 2 мин.

Инкубируют в термостате при температуре (37,0 ± 1,0) °С или (41,5 ± 1,0) °С согласно таблицам 1 и 2.

Таблица 1 — Обогащение пробы для обнаружения бактерии Salmonella spp.

Наименование продукции, от которой отобрана проба	Количество пробы, г	Объем среды (забуференной пептонной воды), $см^3$	Температура инкубирования, °С	Время инкубирования, ч	Анализируемый объем навески, $мм^3$
Готовые продукты из мяса птицы	25	225	(37,0 ± 1,0)	18—24	20
Продукты из мяса птицы (сырые)	25	225	(41,5 ± 1,0)	18—24	20
Объекты окружающей производственной среды	1 губка (спонж)	100	(41,5 ± 1,0)	24—30	20
	1 тампон	10	(41,5 ± 1,0)	24—30	20

Таблица 2 — Обогащение пробы для обнаружения бактерии L.monocytogenes

Наименование продукции, от которой отобрана проба	Количество пробы, г	Объем среды (бульона Фразера), $см^3$	Температура инкубирования, °С	Время инкубирования, ч	Анализируемый объем навески, $мм^3$
Готовые продукты из мяса птицы	25	225	(37,0 ± 1,0)	18—24	20
Продукты из мяса птицы (сырые)	25	225	(41,5 ± 1,0)	18—24	20
Объекты окружающей производственной среды	1 губка (спонж)	100	(41,5 ± 1,0)	24—30	20
	1 тампон	10	(41,5 ± 1,0)	24—30	20

8.2 Лизис

8.2.1 После инкубирования обогащенные пробы извлекают из термостата и осторожно перемешивают содержимое.

8.2.2 Для каждой обогащенной пробы, а также пробы отрицательного контроля готовят по одной лизис-пробирке и помещают в пустой штатив. Отрицательный контроль представляет собой стерильную среду обогащения (забуференную пептонную воду или бульон Фразера полуконцентрированный).

Во избежание вторичного загрязнения распечатывать лизис-пробирки на каждой пластинке следует по очереди, а перед каждым этапом переноса проб необходимо менять наконечник для пипетки.

8.2.3 Переносят 20 мм^3 обогащенной пробы в лизис-пробирку.

8.2.4 Проверяют, нагрелся ли нагревательный блок до температуры (100 ± 1) °С. Помещают штатив с лизис-пробирками в нагревательный блок и оставляют нагреваться в течение (15 ± 1) мин.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Пробы, не прошедшие должную температурную обработку во время этапа лизиса, могут представлять биологическую опасность, поэтому не допускается вставлять их в прибор для молекулярного анализа.

Во время тепловой обработки цвет раствора в лизис-пробирках изменится с розового (холодный) на желтый (горячий).

8.2.5 В качестве альтернативы сухому нагреванию на этапе лизиса можно прибегнуть к нагреванию на водяной бане при (100 ± 1) °С. Необходимо, чтобы уровень воды в бане был выше уровня жидкости в лизис-пробирках. Погружают штатив с лизис-пробирками в водяную баню, нагретую до (100 ± 1) °С, на (15 ± 1) мин.

8.2.6 Извлекают штатив с лизис-пробирками из нагревательного блока и помещают его на охлаждение в охладительный блок (вставной) на (10 ± 1) мин. Во время охлаждения цвет раствора лизис-пробирок снова станет розовым.

8.3 Амплификация

После этапа охлаждения лизис-пробирок из верхней части жидкости в пробирке переносят с помощью микропипетки 20 мм^3 содержимого в реагент-пробирки. Переносить лизат в пробирку следует под определенным углом, чтобы не потревожить осадок. Перемешивают лизат в пробирке с помощью пипетки (набирают и выпускают жидкость из пипетки пять раз).

Реагент-пробирки помещают в прибор для молекулярного анализа. Для размещения реагент-пробирок в приборе используют лоток быстрой загрузки. Лоток входит в комплектацию прибора. Запускают программу. Результаты появятся в течение 75 мин. Положительные результаты могут появиться раньше.

Цель этапа: амплификация ДНК искомой бактериальной клетки и быстрое накопление ДНК. Побочный продукт амплификации — пирофосфат — вступает в реакцию с термостабильной люциферазой (входит в комплект реагент-пробирки). Специфическое свечение в результате данной реакции фиксируется прибором, и результат предоставляется в относительных световых единицах (ОСЕ). Показатель ОСЕ с определенным порогом чувствительности указывает на наличие/отсутствие патогенных микроорганизмов.

8.4 Результаты анализа

Специальный алгоритм анализирует кривую светоотдачи, выводимую в результате обнаружения амплификации нуклеотидных последовательностей. Программное обеспечение автоматически анализирует полученные данные и снабжает их цветовыми кодами. Анализ параметров кривой позволяет получить положительные или отрицательные результаты. Положительные результаты отображаются в реальном времени, а отрицательные — по окончании анализа.

Положительные результаты следует подтверждать серологическими и биохимическими методами в соответствии с ГОСТ 31659, ГОСТ 31468, ГОСТ 32031.

9 Валидация метода

Валидация метода проведена с помощью межлабораторных испытаний по ГОСТ ISO 16140.

Библиография

[1] СП 1.3.2322—08 Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28 января 2008 г.

[2] МУ 1.3.2569—09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности

УДК 637.54:579.67:006.35 ОКС 67.120.20

Ключевые слова: мясо птицы, субпродукты, полуфабрикаты, бактерии рода Salmonella spp., L.monocytogenes, питательные среды, отбор проб, метод молекулярного анализа, система молекулярного анализа, результаты анализа и их интерпретация

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 23.08.2018. Подписано в печать 12.09.2018. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,74.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru