ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57989— 2017

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ

Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе полимеразной цепной реакции

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), Федеральным бюджетным учреждением науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 036 «Продукция пищевая специализированная»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 ноября 2017 г. № 1825-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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 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 (www.gost.ru)

© Стандартинформ, 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

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины, определения и сокращения . . . 3
4 Средства измерения, оборудование и реактивы . . . 3
4.1 Оборудование и средства измерения . . . 3
4.2 Лабораторная посуда и материалы . . . 4
4.3 Реактивы, питательные среды, дезинфицирующие средства . . . 5
4.4 Тест-штаммы . . . 6
5 Подготовка к проведению испытаний . . . 6
5.1 Приготовление растворов и реактивов . . . 6
5.2 Подготовка посуды и материалов . . . 7
5.3 Приготовление питательных сред . . . 7
6 Отбор и подготовка проб к анализу . . . 9
6.1 Общие положения . . . 9
6.2 Первичная обработка пищевых продуктов и подготовка их к посеву в среды обогащения . . . 10
6.3 Посев в среды обогащения . . . 11
6.4 Подготовка проб на средах для первичного обогащения к ПЦР-анализу . . . 12
6.5 Подготовка штаммов бактериальных культур к ПЦР-анализу . . . 13
6.6 Подготовка проб нативных пищевых продуктов к ПЦР-анализу . . . 14
7 Выделение ДНК из анализируемого материала (экстракция ДНК из анализируемых проб) . . . 14
8 Проведение ПЦР-анализа . . . 15
9 Оценка жизнеспособности патогенных микроорганизмов в анализируемых пищевых продуктах . . . 15
10 Учет и интерпретация результатов . . . 16
11 Требования безопасности . . . 17
12 Требования к квалификации оператора . . . 17
Библиография . . . 18

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 массивного 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 *Taq*-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 искомых 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. ejuni*, *C. coli*, *C. lari*), *Listeria* (вида *L. monocytogenes*), энтерогеморрагическим *E. coli* в качестве дополнительных к биохимическим и серологическим методам идентификации.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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 — 2019—01—01

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 документы:

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 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) сернокислое 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 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 9412 Марля медицинская. Общие технические условия

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

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

Издание официальное

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

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

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 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 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 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella

ГОСТ 31747 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

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

ГОСТ Р ЕН 13060 Стерилизаторы паровые малые

ГОСТ Р 51448 (ИСО 3100-2—88) Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

СП 1.2.036—95 Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности

СП 1.3.2322—08 Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов (сводов правил) 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 документ, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого документа с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого документа с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ ISO 16140, ГОСТ ISO 22118.

3.2 Сокращения

В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

ЗПВ — забуференная пептонная вода;

ФБР — фосфатно-буферный раствор;

ТСБДЭ — триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом;

ТСАДЭ — триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом;

RVS-бульон — среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей;

МКТ-бульон — Мюллер-Кауфман тетратионатный бульон;

МПБ — мясо-пептонный бульон;

МПА — мясо-пептонный агар;

ПЦР-FEP — полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации по конечной точке;

ПЦР-FRT — полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

ВКО — неконкурентный внутренний контрольный образец на основе рекомбинантной ДНК;

Ct (пороговый цикл) — значение цикла амплификации, при котором регистрируется пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с установленной пороговой линией.

4 Средства измерения, оборудование и реактивы

4.1 Оборудование и средства измерения

Анализатор потенциометрический с диапазоном измерения pH от 3,0 до 8,0 с точностью ± 0,01 ед. pH при температуре 25 °С по ГОСТ 27987.

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

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 Р 53228.

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 мм^3 с точностью ± 0,8 %.

Гомогенизатор бактериологический перистальтического типа.

Инкубаторы-анаэростаты 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$^{-1}$).

Камера морозильная, обеспечивающая температуру не выше минус 20 °С.

Насос вакуумный (водоструйный).

Облучатель бактерицидный настенный с мощностью бактерицидных ламп 30 Вт и производительностью (95 % обеззараживания) не менее 300 м^3/час.

Отраслевой стандарт для визуальной оценки мутности ОСО-42-28—85П № 10 по [1].

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.

Системы экстракции ДНК/РНК роботизированные.

Система (аппарат) для мембранной фильтрации.

Стерилизатор паровой медицинский (автоклав) по ГОСТ Р ЕН 13060, ГОСТ 31598.

Термостат твердотельный для пробирок типа эппендорф вместимостью 1,5 см^3, диапазон температур от 25 до 100 °С.

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

Холодильник с температурой от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для хранения выделенных проб ДНК по ГОСТ 16317.

Часы механические сигнальные по ГОСТ 14919.

Шкаф сушильно-стерилизационный, позволяющий поддерживать температуру в диапазоне от 50 до 200 °С с погрешностью ± 2 °С.

4.2 Лабораторная посуда и материалы

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 см^3 (плоская крышка, коническое дно) — для амплификаторов с детекцией через дно пробирки; 0,2 см^3 (куполообразная крышка) — для амплификаторов с детекцией через крышку.

Наконечники одноразовые с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования от 0,1 до 1000 мм^3.

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 мм^3.

Пергамент по ГОСТ 1341.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см^3 по ГОСТ 29227.

Пробирки типа эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 см^3.

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

Планшеты иммунологические 96-луночные стерильные.

Пробирки центрифужные конические стерильные вместимостью 15 и 50 см^3.

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.

Термоконтейнер (сумка-холодильник).

Фильтры мембранные микроцеллюлозные стерильные № 3.

Фильтрующие насадки на шприц.

Флаконы и колбы стеклянные по ГОСТ 25336 вместимостью 250, 500, 1000, 2000 $см^3$.

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

Чашки биологические (Петри) стеклянные или одноразовые из полимерных материалов диаметром 90 или 100 мм по ГОСТ 23932.

4.3 Реактивы, питательные среды, дезинфицирующие средства

4.3.1 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 1×10^3 ГЭ/$см^3$ 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 искомых микроорганизмов и внутренним контрольным образцом, отрицательный контрольный образец и внутренний неконкурентный контрольный образец этапа выделения, минеральное масло для ПЦР.

4.3.2 Реактивы, питательные среды для селективного обогащения микроорганизмов и их компоненты

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Ацетон по ГОСТ 2768.

Добавка ростовая аэротолерантная на основе натрия пировинограднокислого, железа (II) сернокислого, натрия метабисульфита для кампилобактерий по [2].

Бриллиантовый зеленый.

Бульон Дойла для накопления кампилобактерий по [2].

Бульон глюкозный с бриллиантовым зеленым и желчью.

Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью.

Бульон Мак-Конки с глюкозой.

Бульон Престона для накопления кампилобактерий по [2].

Бульон селенитовый в модификации Лейфсона.

Бульон Фрейзера полуконцентрированный.

Бульон Фрейзера для вторичного обогащения.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Генцианвиолет.

D-глюкоза по ГОСТ 6038.

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

Железо (II) сернокислое по ГОСТ 4148.

Желчь крупного рогатого скота сухая.

ЗПВ для предварительного неселективного обогащения бактерий рода *Salmonella*.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.

Кислота соляная по ГОСТ 3118.

Кристаллический фиолетовый.

Кровь баранья дефибринированная для питательных сред стерильная.

МКТ-бульон.

МПБ с 1 % глюкозы.

Мультимикротесты для биохимической идентификации энтеробактерий.
Экстракт мясной сухой бактериологический.
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 пировиноградкислый.
Натрий метабисульфит по ГОСТ 11683.
Пептон мясной ферментативный по ГОСТ 13805.
Пептон соевый.
Сафранин.
Среда Кесслер с глюкозой.
Среда Кесслер с лактозой.
Среда обогатительная селективная — бульон для бактерий рода *Shigella*.
Гидролизат казеина ферментативный.
Экстракт дрожжевой сухой.
L-цистеина гидрохлорид.
RVS-бульон.

Питательные среды и препараты должны соответствовать нормам и требованиям, указанным в 4.3.2.

Приготовление и контроль качества питательных сред осуществляют в соответствии с ГОСТ ISO 11133 и [1].

4.3.3 Дезинфицирующие средства

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Средства дезинфицирующие на основе трихлоризоциануровой кислоты, натриевой солидихлоризоциануровой 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.

4.4 Тест-штаммы

Тест-штаммы контрольные бактерий *Listeriamonocytogenes, 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.

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 ± 1) °С с еженедельным пересевом.

5 Подготовка к проведению испытаний

5.1 Приготовление растворов и реактивов

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

5.1.2 Растворы и реактивы для окраски микроскопических препаратов по Граму, растворы красителей (кристаллического фиолетового, генцианвиолета, сафранина, бриллиантового зеленого, бромкрезолового 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.

5.1.3 Фосфатно-буферный раствор

Приготовление концентрированного раствора: (34 ± 0,4) г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) растворяют в 500,0—700,0 см^3 дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 по ГОСТ 1770. Активную кислотность раствора (7,2 ± 0,1) ед. pH устанавливают добавлением 1 Н раствора гидроокиси натрия и доводят дистиллированной водой до 1000,0 см^3. Полученный раствор хранят в емкости, укупоренной резиновой пробкой, в условиях холодильника не более 30 сут.

Приготовление разбавленного раствора: 1,25 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 ± 0,1) ед. pH.

ФБР разливают по 9,0 см^3 в пробирки, по 90,0 см^3 в колбы вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 1770 и по 900,0 см^3 в колбы вместимостью 2000 см^3 по ГОСТ 1770, закрывают ватными пробками. Стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение (20 ± 1) мин.

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

5.1.5 ЗПВ готовят по ГОСТ 31659.

5.1.6 Аэротолерантная добавка для кампилобактерий

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

натрий пировиноградноклислый — 6,25 г;

железо (II) сернокислое — 6,25 г;

натрий метабисульфит — 6,25 г;

стерильная дистиллированная вода — 100 см^3.

Натрий пировиноградноклислый растворяют в 10—20 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 °С не более 1 мес. Раствор чрезвычайно чувствителен к воздействию света, после его добавления к питательным средам их необходимо сохранять в защищенном от света месте.

5.2 Подготовка посуды и материалов

Вымытую посуду стерилизуют в сушильном шкафу при (160 ± 5) °С в течение 2 ч или в паровом стерилизаторе (автоклаве) при (121 ± 1) °С 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.

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

5.3 Приготовление питательных сред

5.3.1 Приготовление и контроль качества питательных сред осуществляют в соответствии с ГОСТ ISO 11133 согласно прописям, указанным на этикетках или в инструкциях изготовителя. Допускается применение сред лабораторного приготовления из отдельных компонентов.

5.3.2 Питательный агар с 1 % глюкозы и питательный бульон с 1 % глюкозы (МПА с 1 % глюкозы, МПБ с 1 % глюкозы) готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1.

5.3.3 ТСБДЭ и ТСАДЭ готовят в соответствии со следующей прописью (г/дм^3):

ферментативный гидролизат казеина — 17,0;

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 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH (7,3 ± 0,2) ед. pH 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.

5.3.4 Среду Кесслер с глюкозой готовят в соответствии со следующей прописью:

пептон мясной ферментативный — 10 г;

D-глюкоза — 2,5 г;

желчь крупного рогатого скота сухая — 5 г (натуральная 50 $см^3$);

1%-ный водный раствор кристаллического фиолетового (генцианвиолета) — 2 $см^3$;

дистиллированная вода — 1000 $см^3$.

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

5.3.5 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, Na_2HPO_4 — 6,45 г;

калий фосфорнокислый однозамещенный безводный, KH_2PO_4 — 2 г;

желчь крупного рогатого скота сухая — 20 г (натуральная 200 $см^3$);

0,5%-ный водный раствор бриллиантового зеленого — 3 $см^3$;

дистиллированная вода — до 1000 $см^3$.

Компоненты растворяют в 900 $см^3$ дистиллированной воды, нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1—2 мин, доводят объем до 1 $дм^3$, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45—55 °С. pH устанавливают таким образом, чтобы он составлял (7,2 ± 0,1) ед. pH при температуре 25 °С, после чего повторно доводят до кипения. Разливают в стерильные пробирки с поплавками по 10 $см^3$.

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

5.3.7 Среду Кесслер с лактозой готовят в соответствии с ГОСТ 31747.

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

5.3.9 Селенитовый бульон в модификации Лейфсона готовят в соответствии с ГОСТ 31659.

5.3.10 RVS-бульон готовят в соответствии с ГОСТ 31659.

5.3.11 МКТ-бульон готовят в соответствии с ГОСТ 31659.

5.3.12 Среду обогатительную селективную — бульон для бактерий рода *Shigella* готовят в соответствии с ГОСТ 32010.

5.3.13 Селективный бульон Престона для накопления кампилобактерий готовят в соответствии со следующей прописью:

Основа среды:

пептон мясной ферментативный — 10 г;

мясной экстракт — 10 г;

натрий хлористый — 5 г;

вода — 920 $см^3$.

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 ± 0,2) ед. pH с помощью 0,1 М раствора HCl или 0,1 М раствора NaOH. Стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Остужают до 45—50 °С.

Готовая среда:

Перед использованием в 920 $см^3$ бульона асептически добавляют: 70 $см^3$ 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 $см^3$ аэротолерантной добавки по 5.1.6, тщательно перемешивают и разливают среду по 90,0 $см^3$ в колбы или флаконы вместимостью 250 $см^3$ или по 9,0 $см^3$ в пробирки.

5.3.14 Селективный бульон Дойла для накопления кампилобактерий готовят в соответствии со следующей прописью:

Основа 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 $см^3$.

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 ± 0,2) ед. pH при 25 °С. Стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Остужают до температуры 45 °С.

Готовая среда:

Перед использованием в 460 $см^3$ основы асептически добавляют 35 $см^3$ стерильной дефибринированной крови барана, а также растворенное в 5 $см^3$ 50%-ного раствора этанола содержимое одного флакончика с добавкой антибиотиков модифицированной III (по Дойлу). Тщательно перемешивают и разливают в по 90,0 $см^3$ в колбы или флаконы вместимостью 250 $см^3$ или по 9,0 $см^3$ в пробирки.

5.3.15 Бульон Фрейзера

Бульон Фрейзера полуконцентрированный для предварительного селективного обогащения и бульон Фрейзера для селективного (вторичного) обогащения готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

6 Отбор и подготовка проб к анализу

6.1 Общие положения

6.1.1 Отбор проб пищевых продуктов для анализа проводят согласно методам отбора по ГОСТ 31904, ГОСТ ISO 7218, [3], [4], а также в соответствии с требованиями нормативных документов на конкретные виды продуктов.

6.1.2 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.

6.1.3 Общая масса или объем отбираемых проб должны быть достаточными для проведения анализа — (200 ± 50) г/$см^3$.

6.1.4 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 по [5].

Для анализа на наличие микроаэрофильных бактерий рода *Campylobacter* пробы твердых продуктов отбирают по [2] в стерильные полимерные пакеты, пробы жидких продуктов — в контейнеры стерильные с крышками.

6.1.5 Отобранные пробы пломбируют или опечатывают, маркируют.

6.1.6 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.

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

6.2.1 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.

6.2.2 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.

6.2.3 Подготовку 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 Р 51448, 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; быстрозамороженных и поверхностно-контаминированных плодоовощных продуктов по [6];
- проб детского и диетического питания — по [4];
- проб кремово-кондитерских изделий — по [7];
- 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.

6.2.4 Замороженные продукты предварительно размораживают в защищенном от света месте при температуре (2 ± 2) °С в течение не более 18 ч или в течение 1 ч в термостате при температуре (19 ± 1) °С.

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

6.2.5 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.

6.2.6 Из суспензии или гомогената отбирают необходимое количество пробы продукта в стерильную чашку Петри, в стерильный контейнер с крышкой или на куске стерильного пергамента[1)]. 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 ± 0,1) г(см^3). Масса пробы продуктов детского и диетического питания находится в диапазоне от (25 ± 0,1) до (300 ± 1) г(см^3) и определяется действующими гигиеническими нормативами по [8].

6.2.7 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).

6.2.8 В кислых или кислотосодержащих (с pH < 6,0 ед. pH) жидких пищевых продуктах для предотвращения снижения pH питательных сред на 0,5 ед. pH и более pH перед посевом доводят pH пробы до (7,0 ± 0,2) ед. pH стерильными растворами гидроокиси натрия и соляной кислоты; в высококислотных

[1)] При отмеривании гомогената продукта учитывают количество добавленной при гомогенизации жидкой обогатительной среды по 6.2.5.

продуктах твердых — pH доводят до (7,0 ± 0,2) ед. pH после посева непосредственно в посевной жидкости. Измерения pH проводят в условиях асептики.

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

6.3 Посев в среды обогащения

6.3.1 Подготовленные по 6.2 пробы засевают в жидкие питательные среды и инкубируют для подращивания находящихся в пищевых продуктах патогенных бактерий и накопления их биомассы.

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

6.3.2 Первичный посев пищевых продуктов для накопления бактерий рода *Salmonella* проводят в неселективную жидкую среду ЗПВ по 5.1.5, подогретую до (37 ± 1) °С, при соотношении продукта и среды не менее 1:9. Например, пробу массой 25 г засевают в 225 см^3 ЗПВ, 50 г — в 450 см^3 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 5.3.10 и в одной из двух сред — в селенитовом бульоне по 5.3.9 или в МКТ-бульоне по 5.3.11 Для этого по 1 см^3 инокулята из ЗПВ пересевают в 10 см^3 каждой из указанных сред. Посевы в RVS-бульоне инкубируют при (41,5 ± 1) °С в течение 24 ч, в селенитовом бульоне и МКТ-бульоне — при (37 ± 1) °С 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.

6.3.3 Посев пищевых продуктов для накопления бактерий рода *Shigella* проводят непосредственно в среды селективного обогащения — в селенитовый бульон в модификации Лейфсона по 5.3.9 и в бульон для бактерий рода *Shigella* по 5.3.12, используя соотношение 1:9. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (18 ± 2) ч. Дальнейшая инкубация может привести к ингибиции роста бактерий рода *Shigella*, чувствительных к накоплению кислых продуктов метаболизма.

Для ПЦР-анализа используют культуральную жидкость обеих селективных сред.

6.3.4 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 см^3 неселективной жидкой среды ЗПВ по 5.1.5, подогретой до (37 ± 1) °С. Инкубируют при этой температуре в течение (18 ± 2) ч.

По окончании инкубации в ЗПВ проводят вторичное обогащение, для чего по 1 см^3 инокулята пересевают параллельно в пробирки с 10 см^3 жидких селективных сред с лактозой по 5.3.7 и 5.3.8.

Молочные продукты подлежат посеву только в среду Кесслер с лактозой.

Посевы термостатируют при (37 ± 1) °С 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 6.2 продукты нормируемой массы или их соответствующие децимальные разведения в ЗПВ засевают непосредственно в пробирки с селективными средами с лактозой по 5.3.7 или 5.3.8. Посевы проверяют на наличие признаков роста через (22 ± 2) ч инкубации при (37 ± 1) °С, отмечая образование кислоты и газа из лактозы (при отсутствии признаков роста инкубируют посевы еще 24 ч), после чего используют для ПЦР-анализа.

6.3.5 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 дм^3 ФБР по 5.1.3 или ЗПВ по 5.1.5, подогретой до (37 ± 1) °С, термостатируют при температуре (37 ± 1) °С 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. 5.3.4), или глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью (см. 5.3.5), или бульон Мак-Конки (см. 5.3.6). Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (22 ± 2) ч.

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

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

К необходимому количеству подготовленной по 6.1.4 и 6.2.5 пробы добавляют девятикратный объем селективного бульона Престона по 5.3.13 или селективного бульона Дойла по 5.3.14. При анализе жировых молочных продуктов седимент, приготовленный согласно 5.2.7, предварительно растворяют в 10 см^3 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 посевы 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.

6.3.7 Первичный посев пищевых продуктов для накопления бактерий *L. monocytogenes* проводят в бульон Фрейзера для предварительного селективного обогащения по 5.3.15. Подготовленную пробу массой 25 г(см^3) вносят непосредственно в 225 см^3 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 1,0 см^3 суспензии в 10 см^3 бульона Фрейзера для вторичного селективного обогащения листерий по 5.3.15, 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 (бульона Фрейзера) для вторичного селективного обогащения листерий.

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

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

6.4.1 Подготовленные по 6.3.2—6.3.7 пробы используют для ПЦР-анализа сразу после окончания инкубации.

6.4.2 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.

6.4.3 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).

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

6.5 Подготовка штаммов бактериальных культур к ПЦР-анализу

6.5.1 При идентификации культур, выделенных из пищевых продуктов, используют изолированные колонии, характерные для патогенных микроорганизмов, указанных в 4.4, 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 (ЕНЕС) — 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 (полимиксин-акрифлавин-лития хлорид-цефтазидим-эскулин-маннитол агаром), оксфордским агаром, ПАЛ-агаром.

6.5.2 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 6.5.1 селективных сред, производят посев штрихом на поверхность плотных питательных сред МПА или ТСАДЭ по 5.2.3 в отдельных чашках Петри или в пробирки с жидкими средами (МПБ или ТСБДЕ) и инкубируют в течение (22 ± 2) ч при (37 ± 1) °С.

Изоляты, предположительно относящиеся к роду *Campylobacter*, засевают на поверхность кровяного колумбийского агара или в бульон для бруцелл и инкубируют при (42 ± 1) °С в течение 24—48 ч в микроаэрофильной атмосфере.

Изоляты, предположительно относящиеся к *Cronobacter (E. sakazakii)*, пересевают на поверхность ТСАДЭ и термостатируют при температуре 25 °С в течение 72 ч.

6.5.3 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, A—G) вносят по 0,2 $см^3$ 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 $см^3$ из каждой лунки в ряду переносят в крайнюю пустую лунку (лунка 12). Эту операцию проводят в каждом ряду лунок (*A*, *B*, C, *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 тестированных «стоковых» образцах. Выделенные чистые культуры ЕНЕС подвергают дальнейшему анализу.

6.5.4 Бактериальные культуры могут быть представлены для ПЦР-анализа в пробирках на агаризованной среде в соответствии с СП 1.2.036—95. 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 ± 1) °С.

6.5.5 Культуры, полученные по 6.5.2 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.

6.6 Подготовка проб нативных пищевых продуктов к ПЦР-анализу

6.6.1 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).

6.6.2 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 5.1.4 и ресуспендируют.

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

6.6.3 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—6 см^3 стерильного изотонического раствора натрия хлористого для десорбции бактерий.

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

6.6.4 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 5.1.3 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 см^3 для экстракции ДНК в пробирку типа эппендорф емкостью 1,5 см^3 и не менее 2 см^3 — для посева на питательные среды; если плотный — предварительно ресуспендируют в 0,2—0,5 см^3 стерильной деионизированной воды.

6.6.5 Подготовленные по 6.6.2—6.6.4 пробы хранению не подлежат и используются для экстракции ДНК сразу после окончания пробоподготовки.

7 Выделение ДНК из анализируемого материала (экстракция ДНК из анализируемых проб)

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

7.2 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 искомых патогенных бактерий; 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.

7.3 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 6.3, 6.4 и 6.5, 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.

7.4 Допускается проводить экстракцию ДНК из проб нативных пищевых продуктов по 7.3. 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.

8 Проведение ПЦР-анализа

8.1 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 4.3.1, обеспечивающих постановку любого их двух вариантов гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации — по конечной точке (*FEP*) и в режиме реального времени (*FRT*).

8.2 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.

8.3 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.

9 Оценка жизнеспособности патогенных микроорганизмов в анализируемых пищевых продуктах

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

9.2 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 6.4.2. Для оценки жизнеспособности микроорганизмов может применяться только ПЦР-FRT.

Результаты ПЦР, регистрируемые в процессе реального времени и показывающие различия в значениях Ct (пороговых циклов амплификации) для парных образцов на три единицы и более ($Ct_{не\ инк.}$ — $Ct_{инк.} \geq 3$, $Ct_{не\ инк.}$ — цикл амплификации не инкубированного образца, $Ct_{инк.}$ — 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

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

При исследовании проб обогащенных пищевых продуктов в селективных питательных средах по 6.4.1 проводят прямой посев в количестве 0,1 $см^3$ на поверхность соответствующих агаризованных селективно-дифференциальных сред, используемых для выделения патогенных бактерий, указанных в 6.5.1, используют не менее двух сред.

При исследовании проб нативных пищевых продуктов, отобранных при расследовании вспышек по 6.6, одновременно проводят:

а) прямой посев на поверхность соответствующих агаризованных селективно-дифференциальных сред по 9.3.2;

б) посев по 0,1—1,0 $см^3$ в 10 $см^3$ соответствующих жидких питательных сред для селективного обогащения по 6.3.2—6.3.7. После инкубирования сред производят пересев на поверхность агаризованных селективно-дифференциальных сред по 6.5.1.

На данном этапе допускается проведение посева методом парных проб по 6.4.2 с приготовлением контрольного образца, подвергающегося замораживанию при минус 20 °С и не подлежащего инкубации.

9.4 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 6.5 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, [8] на принадлежность к родам, видам, серотипам искомых патогенных бактерий.

Для подтверждения принадлежности культур к искомым патогенным бактериям могут применяться мультимикротесты для биохимической идентификации по 4.3.2.

9.5 При анализе бактериальных культур по 6.5 подтверждение жизнеспособности не требуется.

10 Учет и интерпретация результатов

10.1 Результаты оценивают по каждой анализируемой пробе отдельно.

10.2 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.

10.3 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.

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

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

11 Требования безопасности

11.1 При выполнении анализа необходимо соблюдать требования безопасности при подготовке и проведении анализа, требования безопасности при работе с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007, пожаробезопасности — по ГОСТ 12.1.018, электробезопасности — по ГОСТ Р 12.1.019, а также требования, изложенные в технических документах на применяемые средства измерений и вспомогательное оборудование. Микробиологические исследования проводят с соблюдением требований ГОСТ ISO 7218, СП 1.3.2322—08, [10].

11.2 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 безопасности класса II.

11.3 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 4.3.3.

12 Требования к квалификации оператора

Выполнение измерений могут проводить только специально обученные специалисты, после освоения техники ПЦР — анализа и приемов по эксплуатации аппаратуры. Персонал должен допускаться к работе в одноразовой лабораторной одежде (халат, шапочка, резиновые или пластиковые перчатки, маска, бахилы).

Библиография

[1] МУК 4.2.2316—08 Методические указания «Методы контроля бактериологических питательных сред», утверждены и введены в действие руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 18 января 2008 г.

[2] МУК 4.2.2321—08 Методические указания «Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах», утверждены и введены в действие главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г. Онищенко 24 января 2008 г.

[3] Инструкция о порядке расследования и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях, утверждена заместителем министра здравоохранения СССР, главным государственным санитарным врачом СССР П.Н. Бургасовым 20 декабря 1973 г., № 1135—73. М., 1975

[4] МУК 4.2.577—96 Методические указания «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов», утверждены первым заместителем председателя Госкомсанэпиднадзора России, заместителем главного государственного санитарного врача Российской Федерации 29 октября 1996 г.

[5] СанПиН 2.1.3.2630—10 Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность», утверждены Постановлением № 58 главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г.Г. Онищенко 18 мая 2010 г.

[6] Инструкция по микробиологическому контролю быстрозамороженной плодоовощной продукции, согласована заместителем главного государственного санитарного врача СССР В.И. Чибураевым 29 сентября 1989 г.

[7] МУК 4.2.762—99 Методические указания «Методы микробиологического контроля готовых изделий с кремом», утверждены первым заместителем министра здравоохранения Российской Федерации — главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 2 июля 1999 г.

[8] ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции», утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 880

[9] МУК 4.2.3144—13 Методические указания «Метод определения бактерий *Enterobacter sakazakii* в продуктах для питания детей раннего возраста. Дополнения и изменения к МУК 4.2.2428—08», утверждены врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главного государственного санитарного врача Российской Федерации А.Ю. Поповой 26 ноября 2013 г.

[10] МУ 1.3.2569—09 Методические условия «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности», утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 22 декабря 2009 г.

УДК 579.672:637.065:006.354 ОКС 07.100.30 67.050 Н59

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

БЗ 12—2017/222

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *В.А. Голев*

Сдано в набор 27.11.2017. Подписано в печать 10.01.2018. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,51. Тираж 27 экз. Зак. 2612.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
www.jurisizdat.ru gost.e-ecolog.ru

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001, Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru