4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод выявления и определения бактерий рода Salmonella и Listeria monocytogenes на основе гибридизационного ДНК-РНК анализа

Методические указания
МУК 4.2.1955—05

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны: ГУ научно-исследовательский институт питания РАМН (В. А. Тутельян — руководитель, С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, А. М. Григорьев, И. Б. Быкова, И. М. Нитяга); ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН (В. Г. Нестеренко); Центром госсанэпиднадзора в г. Москве (Н. Я. Салова, З. Г. Малышева); при участии Санкт-Петербургского ГУ «Центр контроля качества товаров (продукции), работ и услуг» (Н. И. Лебедева, Л. Б. Гамова, М. С. Колосова) и фирмы ООО «Ниармедик плюс» (С. В. Юров, Т. Б. Макарова, Д. О. Газдиев, А. Б. Швецов).

2. Утверждены и введены в действие 22 февраля 2005 г. Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко.

3. Введены взамен временных методических указаний МУК 4.2.1840—04 «Метод экспрессного выявления бактерий рода Salmonella и Listeria monocytogenes в пищевых продуктах и продовольственном сырье за 24 часа с использованием твердофазного гетерогенного гибридизационного ДНК-рРНК анализа», утвержденных 29.02.04.

Содержание

I. Введение 112
2. Общие положения и область применения 112
3. Сущность метода 113
4. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды 114
4.1. Аппаратура и инструментарий 114
4.2. Лабораторная посуда и материалы 116
4.3. Реактивы и питательные среды 116
4.4. Наборы для проведения твердофазного гибридизационного ДНК-рРНК анализа 119
5. Подготовка к анализу 120
5.1. Приготовление растворов и реактивов 120
5.2. Приготовление питательных сред 120
5.3. Подготовка к проведению твердофазного гибридизационного ДНК-рРНК анализа 122
6. Отбор и подготовка проб к анализу 122
7. Проведение анализа по подтверждению принадлежности бактерий рода Listeria к виду L. monocytogenes 123
8. Проведение анализа по выявлению и определению бактерий рода Salmonella 127
8.1. Проведение экспрессного скринингового анализа по обнаружению бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах и смывах с поверхности оборудования и инвентаря 127
8.2. Проведение анализа по подтверждению принадлежности выделенных культур к роду Salmonella 130
9. Требования безопасности 131
10. Нормативные ссылки 132

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
22 февраля 2005 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод выявления и определения бактерий рода Salmonella и Listeria monocytogenes на основе гибридизационного ДНК-РНК анализа

Методические указания
МУК 4.2.1955—05

I. Введение

Проведение контроля пищевых продуктов и продовольственного сырья традиционными методами микробиологического анализа на наличие патогенных микроорганизмов – малоизученных возбудителей новых и вновь возникших заболеваний (Listeria monocytogenes, антибиотикорезистентных сальмонелл, энтерогеморрагических эшерихий) связано с такими проблемами, как трудоемкость, длительность и недостаточная специфичность используемых методик.

Последнее обусловлено тем, что в качестве тестов идентификации, входящих в стандартизованные методы анализа, в настоящее время используют в основном характеристики метаболических свойств возбудителей, зачастую не позволяющие провести четкую дифференциацию патогенных представителей искомых родов и видов от непатогенных, имеющих одинаковое с патогенами фенотипическое выражение. Это снижает достоверность результатов анализа, осложняет оценку распространенности патогенов в пищевых продуктах и сырье и не гарантирует от необоснованных браковок продукции.

Наиболее достоверными в последние годы признаются методы генотипического анализа культур, выделенных на селективных питательных средах, основанные на выявлении кодируемых признаков патогенности или анализе последовательностей рибосомальной ДНК (16S, 26s рРНК). В связи с этим внедрение высокоспецифичных методов анализа и экспрессных диагностических тест-систем в официальные схемы санитарно-микробиологического контроля пищевых продуктов становится насущной необходимостью, которая позволит повысить эффективность работы и рационализировать ресурсы контрольных органов.

2. Общие положения и область применения

2.1. Настоящие методические указания устанавливают метод ускоренного выявления бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах и в смывах с поверхностей обо-

рудования и инвентаря предприятий по производству пищевых продуктов, а также методы ускоренной (за 24 ч) идентификации культур, выделенных из указанных объектов и подозрительных на принадлежность к Listeria monocytogenes и бактериям рода Salmonella, на основе твердофазного гетерогенного гибридизационного ДНК-РНК анализа с хемилюминесцентным детектированием.

2.2. Методы могут применяться в качестве альтернативных классическим бактериологическим методам лабораторных исследований для целей экспрессного выявления бактерий рода Salmonella и/или подтверждения принадлежности выделенных микробиологическими методами культур к бактериям рода Salmonella и Listeria monocytogenes при контроле пищевых продуктов и состояния поверхностей предприятий по производству пищевых продуктов.

2.3. Предлагаемый метод ускоренного выявления бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах и на поверхности оборудования и инвентаря предусматривает определение наличия или отсутствия указанных микроорганизмов в определенной массе (объеме) продукта в соответствии с нормативами СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», выраженными в альтернативной форме и основанными на существующей системе отбора образцов и оценки результатов анализа по двухклассной системе, или в определенном объеме смыва с поверхности.

2.4. При исследовании пищевых продуктов и состояния оборудования и инвентаря предприятий по производству пищевых продуктов на наличие патогенных микроорганизмов Listeria monocytogenes методами классического микробиологического анализа, метод гетерогенной твердофазной ДНК-РНК гибридизации может применяться для идентификации культур листерий после этапа их выделения на селективных дифференциально-диагностических средах.

2.5. Методические указания разработаны в соответствии с Федеральным законом от 02.01.00 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов», Положением о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, Положением о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации.

2.6. Методические указания рекомендованы для применения в лабораториях учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за производством, хранением и оборотом пищевых продуктов, в т. ч. импортируемых в Российскую Федерацию, при проведении гигиенической оценки и выдаче санитарно-эпидемиологических заключений, а также при проведении санитарно-эпидемиологических расследований заболеваний, имеющих пищевой путь передачи; в лабораториях других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения контроля безопасности пищевой продукции и продовольственного сырья; в организациях, независимо от форм собственности, осуществляющих производственный контроль продовольственного сырья и пищевых продуктов в процессе промышленного производства и выпуска продукции.

3. Сущность метода

3.1. Метод гетерогенного твердофазного гибридизационного анализа нуклеиновых кислот основан на принципе гибридизации участка бактериального генома с закрепленным на твердофазном носителе (стенке пробирки) комплементарным к определяемой последовательности ДНК олигонуклеотидным зондом, меченым флюоресцентным красителем, и последующей детекции гибридов по степени их хемилюминесценции в приборе-люминометре.

3.2. Метод может выполняться в формате коммерчески доступных тест-систем (наборов), прошедших регистрацию в РФ в установленном порядке, после процедуры их стандартизации относительно официально утвержденных методов анализа.

3.3. Метод ускоренного выявления бактерий рода Salmonella предусматривает высев определенных количеств исследуемых образцов (пищевых продуктов или смывной жидкости) в специальные неселективные и селективные питательные среды, инкубирование посевов для накопления микроорганизмов, обработку культуральной жидкости лизирующим буфером для денатурации бактериальной рибосомальной РНК, гибридизацию фрагментов денатурированной рРНК с комплементарным ей меченым зондом, входящим в набор «Люмипроб-24 Salmonella», хемилюминесцентным детектированием продуктов реакции.

При обнаружении положительных результатов присутствие бактерий рода Salmonella должно подтверждаться в соответствии с ГОСТ 30519—97 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella».

3.4. Метод ускоренной идентификации культур, выделенных из пищевых продуктов и с поверхности оборудования и инвентаря пищевых производств по ГОСТ 30519—97 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода Salmonella», ГОСТ Р 51921—2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes» или по МУК 4.2.1122—02 «Организация контроля и методы выявления бактерий Listeria monocytogenes в пищевых продуктах», и подозрительных на принадлежность к бактериям рода Salmonella и Listeria monocytogenes, предусматривает инкубирование культур для накопления микроорганизмов, обработку культуральной жидкости лизирующим буфером для денатурации бактериальной рибосомальной РНК, гибридизацию фрагментов денатурированной рРНК с комплементарным ей меченым зондом, входящим в состав наборов «Люмипроб-24 Salmonella» или «Люмипроб-24 Listeria monocytogenes», хемилюминесцентным детектированием продуктов реакции.

3.5. Мишенями в реакции ДНК-РНК гибридизации являются:

- для бактерий рода Salmonella – последовательность нуклеотидов в области ДНК, кодирующая продукцию рибосомальной РНК, строго специфичной для всех представителей рода Salmonella;
- для Listeria monocytogenes – последовательность ДНК, кодирующая продукцию токсического белка листериолизина-О – основного фактора патогенности возбудителя листериоза.

4. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды

4.1. Аппаратура и инструментарий

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80 П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру (37 ± 1) °С	ТУ 64-1-1382—83
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру (41,5 ± 1,0) °С	ТУ 64-1-1382—83

Баня водяная с подогревом (37 ± 1) °С	ГОСТ 12026—76
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру от 0 до 100 °С	ТУ 42-22-608—75
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБР-1, МБР-3, МБС	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72
Гомогенизатор перистальтического типа «Микс-2», «Стомайкер» или других наименований, AES Lab., Cat. № AESAP 1066	
Гомогенизатор типа «вортекс»	
Штатив для 12-миллиметровых пробирок с держателем, «Europrobe», Cat. № P08363086	
Микропипетки на 200—1 000 мкл, BIOHIT, Cat. № 720040 или «Ленпипет»	
Мультистеппер, BIOHIT, Cat. № 730101	
Диспенсер, BIOHIT, Cat. № 723046	
Распределительная емкость – объем 1—2,5 л, BIOHIT	
Люминометр для пробирок «Люмлайт» или «Люмлайт мини», «Europrobe», Cat. № EBLL01	
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ-16-535—84
Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 16317—87
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145—84
Электроплитка	ГОСТ 14919—83
Аппарат универсальный для встряхивания жидкости в колбах и пробирках (или другая аппаратура для встряхивания)	ТУ 64-1-2451—78

4.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Пипетки, вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932—90
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С (цена деления шкалы 1 °С)	ГОСТ 13646—68
Чашки биологические (Петри) или одноразовые из полимерных материалов	ГОСТ 23932—90
Пакеты стерильные для гомогенизатора, AES Lab., Cat. № AES400/50G	
Отраслевой стандарт для визуальной оценки мутности № 10, ГИСК им. Л. А. Тарасевича, МЗ РФ	
Денситометр для бактериальных суспензий типа «Densi-La-Meter» или «Densimat», ф. «Лахема», «BioMerieux»	
Стандарт Макфарланда № 1, 2, 3, ф. «BioMerieux»	
Петля бактериологическая калиброванная на 1 мкл, AES Lab., Cat. № AESDI100	

4.3. Реактивы и питательные среды

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
D-глюкоза, ч	ГОСТ 6038—79
D-лактоза, 1-водная	ТУ 6-09-22-98—79

Маннит	
Ксилоза	
Рамноза	
Калия гидроокись	ГОСТ 24363—80
Калий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Калий фосфорно-кислый двузамещенный 3-водный	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Литий хлористый, ч или хч, или чда	ГОСТ 4328—77
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 31739—78
Набор реактивов для окраски по Граму	
Натрий-аммоний фосфорно-кислый двузамещенный, 4-водный, ч или хч	ГОСТ 4170—78
Натрия гидроокись, чда	ГОСТ 4328—77
Натрий лимонно-кислый, 5,5-водный, чда	ГОСТ 22280—75
Натрий хлористый, ч или хч, или чда	ГОСТ 4233—77
Пара-диметиламидобензальдегид, ч	ТУ 6-09-3272—77
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805—76
Полимиксин «М» или «В» сульфат по 500 000 ед. (медпрепарат)	
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Железа аммонийного цитрат	
Феноловый красный	ГОСТ 5853—51
Фенолфталеин	ГОСТ 5850—72
Фуксин основной	ТУ 6-09-4119—75
Хлороформ технический	ГОСТ 2-15-76—72
Уксусная кислота	ГОСТ 61—75
Сульфаниловая кислота	
А-нафтол	
Цинк порошкообразный	ГОСТ 3640

Эскулин	
Экстракт дрожжевой сухой	
Лития хлорид	
Налидиксовая кислота Lab M, HiMedia	
Акрифлавина гидрохлорид (трипафлавин),+ Lab M, HiMedia	
Цефтазидим	
Циклогексимид	
Тест-штаммы Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii, Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Rhodococcus equi, Salmonella typhimurium, типичные по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам, ГИСК им. Л. А. Тарасевича	
Пептонная вода забуференная (сухая), «BioMerieux» 51094	
Триптозный ГРМ-агар и ГРМ-бульон ФС42-3377—97 (ГНЦПМ)	
Среда ГРМ № 1 ВФС 42-2988—97 (ГНЦПН)	
Питательный бульон и питательный агар	ТУ 10-02-02-789-176—94
Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA), HiMedia M1214	
Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB), HiMedia M1263	
Среда RM LP24 Europrobe (Ref. EB2307, EB23002, EB23004)	
Бульон Фразера (Fraser Broth), «BioMerieux» 42046	
Бульон Фразера половинной концентрации (Half Fraser Broth), «BioMerieux» 42048	
Fraser Broth Base, Fraser Supplement, Fraser Selective Supplement, HiMedia M 1327, FD 141, FE1251	
Бульон для обогащения Listeria Enrichment Broth Merck 1.10549, HiMedia M569	
Бульон вторичного обогащения для листерий – Fraser Secondary Enrichment Broth Base, HiMedia Ml 083	
Селективный бульон для листерий – Listeria Selective Broth Base, HiMedia M889	
Среда RV Europrobe (Ref. EB2055, EB22502, EB22504)	
PALCAM – Listeria Selective Agar Base с селективной добавкой 1.12122, Merck I.I 1755	

PALCAM-агар – селективная среда для выделения листерий, «BioMerieux» 43559

Агар для идентификации листерий – Listeria Identification Agar Base (PALCAM), HiMedia Ml 064

Oxford-агар – селективная среда для выделения листерии, «BioMerieux» 43560

Listeria Oxford Medium Base и Oxford Listeria Supplement, HiMedia MI 145, FD071

Среды Гисса с маннитом, ксилозой, рамнозой, ФС (ЦНИИВС им. И. И. Мечникова, НИИ питательных сред)

Среда для определения подвижности листерий (Listeria motility medium), HiMedia M 1215

SIM-агар (сероводород-индол-подвижность). Difco

Blood Agar Base – основа кровяного агара, HiMedia M073

Тест-системы биохимические для видовой идентификации API Listeria, «BioMerieux»

Среда Висмут-сульфитный агар для селективного выделения микроорганизмов рода Salmonella – в сухом виде для приготовления по способу, указанному в каталоге питательных сред, Cat. № 51 065, «BioMerieux»

API 20 E – система для биохимической идентификации Enterobacteriaceae и других грамотрицательных палочек, Cat. № 20 100, «BioMerieux»

Сухие агглютинирующие адсорбированные поливалентные сальмонеллезные сыворотки основных групп А, В, С, Д, Е и редких групп

4.4. Наборы для проведения твердофазного гибридизационного ДНК-рРНК анализа

Набор «Lumiprobe 24 Listeria monocytogenes» на 50 тестов «Europrobe» (Ref. 11005) в составе:

- пробирки с фиксированным на них зондом (5 пакетов × 10 пробирок);
- лизирующий буфер (1 флакон × 5 мл);
- гибридизационный буфер (1 флакон × 12 мл);
- 20-кратный промывочный буфер (4 флакона × 30 мл);
- конъюгат (1 флакон × 5 мл);
- субстрат (1 флакон × 5 мл);
- уплотняющая пленка (6 шт).

Набор Lumiprobe 24 Salmonella на 50 тестов «Europrobe» (Ref. 11055) в составе:

- пробирки с фиксированным на них зондом (5 пакетов × 10 пробирок);
- лизирующий буфер (1 флакон × 5 мл);
- гибридизационный буфер (1 флакон × 12 мл);

- 20-кратный промывочный буфер (4 флакона × 30 мл);
- конъюгат (1 флакон × 5 мл);
- субстрат (1 флакон × 5 мл);
- уплотняющая пленка (6 шт).

Примечание. Допускается использование других питательных сред и диагностических препаратов с аналогичными характеристиками, прошедших регистрацию в РФ в установленном порядке, после процедуры их стандартизации относительно официально утвержденных методов анализа.

Питательные среды и биологические препараты отечественного и зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29 000. Питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

5. Подготовка к анализу

5.1. Приготовление растворов и реактивов

5.1.1. Пептонно-солевой раствор (ГОСТ 26669—85).

5.1.2. Изотонический (0,85 %-ный водный) раствор хлорида натрия (ГОСТ 26669—85).

5.1.3. Растворы и реактивы для постановки реакции нитратредукции (ГОСТ 10444.8—99).

5.1.4. Приготовление растворов и реактивов для окраски препаратов по Граму или в соответствии с инструкцией по применению (ГОСТ 10444.1).

5.1.5. Раствор перекиси водорода для определения каталазы 3 %-ный (ГОСТ 30425—97).

5.1.6. Стерильный фосфатный буфер с pH (7,2 ± 0,1) KH_2PO_4 – 0,45 г, Na_2HPO_4 – 5,34 г в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды, стерилизовать при температуре 121 °С в течение 30 мин.

5.2. Приготовление питательных сред

5.2.1. Среды промышленного изготовления, поименованные в п. 4.3, готовят согласно прописям на этикетке или в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

5.2.2. Приготовление среды RM LP 24 («Europrobe»): навеску 34,6 г растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды, осторожно перемешивают до растворения (при необходимости немного подогревают), устанавливают pH 7,2 ± 0,2 при 25 °С и автоклавируют при 115 °С в течение 15 мин. Простерилизованную горячую среду 70—80 °С быстро охлаждают до температуры 10—12 °С в холодной воде. Готовую среду хранят при температуре не выше 8 °С в течение 14 дней.

5.2.3. Приготовление среды RV («Europrobe»): навеску 26,6 г растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды, осторожно перемешивают до растворения (при необходимости немного подогревают), устанавливают pH 5,1 ± 0,2 при 25 °С и автоклавируют при 115 °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят при температуре не выше 8 °С в течение 14 дней.

5.2.4. 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—84 «Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

5.2.5. Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом, триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом.

Состав сред (г/л): ферментативный гидролизат казеина – 17,0; пептон соевый – 3,0; натрий хлористый – 5,0; фосфат калия однозамещенный – 2,5; глюкоза – 2,5; дрожжевой экстракт – 6,0; агар микробиологический (для TSYEA) – 15,0.

Компоненты растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,3 ± 0,2 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.

5.2.6. PALCAM-агар (полимиксин-акрифлавин-лития хлорид-цефтазидим-эскулин-маннитол – агар) – селективная дифференциально-диагностическая среда для выделения листерий.

Приготовление основы среды (г/л): пептон мясной ферментативный – 23,0; дрожжевой экстракт – 3,0; крахмал – 1,0; натрия хлорид – 5,0; эскулин – 0,8; лития хлорид – 15.0; железа аммония цитрат – 0,5; глюкоза – 0,5; маннит – 10,0; феноловый красный – 0,08; агар –15,0 – растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,0 ± 0,2 и автоклавируют при 121 °С 15 мин.

К стерильной расплавленной основе среды добавляют асептически раствор селективных компонентов следующего состава: акрифлавин – 0,005; полимиксин «В» – 100 000 ед.; цефтазидим – 0,02 в 10 $см^3$ стерильной дистиллированной воды. Готовую среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С.

5.2.7. Селективная дифференциально-диагностическая среда для выделения листерий типа Оксфорд-агара.

Приготовление основы среды (г/л): пептон мясной ферментативный – 23,0; крахмал кукурузный – 1,0; натрия хлорид – 15,0; эскулин – 1,0; лития хлорид – 15,0; железа аммония цитрат – 0,5; глюкоза – 0,5; агар – 15,0 растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,0 ± 0,2 и автоклавируют при 121 °С 15 мин.

К стерильной расплавленной основе среды добавляют асептически раствор селективных компонентов следующего состава: акрифлавина гидрохлорид – 0,005; циклогексимид – 0,4, колистина сульфат* – 0,02, цефатетан* – 0,002, фосфомицин* – 0,01 мг в 10 $см^3$ 50 %-ного этилового спирта. Готовую среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °С.

5.2.8. Кровяной агар. К растопленному и охлажденному до 45—50 °С питательному агару с 1 % глюкозы по п. 5.2.4 добавляют 5 % по объему дефибринированной крови животных. Разливают в чашки Петри диаметром 90 мм по 15 $см^3$ среды и подсушивают при 37 °С. Засев производят в теплые чашки.

5.2.9. Питательный агар с эритроцитами барана. Дефибринированную или стабилизированную цитратом кровь барана центрифугируют в асептических условиях 30 мин при 900 об./мин. Надосадочную жидкость сливают. Осадок суспендируют в стерильном физиологическом растворе до первоначального объема, добавляют в количестве 5 % по объему к растопленному и охлажденному до 45—50 °С питательному агару. Разливают в чашки Петри по 10 $см^3$, подсушивают при 37 °С. Засев производят в теплые чашки.

5.2.10. Среда для определения подвижности: 20 г гидролизата казеина ферментативного, 6 г пептона мясного ферментативного и 5 г агара растворяют в 1 000 $см^3$ дис-

* Допускается замена комплекса перечисленных антибиотиков на полимиксин в количестве 500 000 ед. на 1 $дм^3$ среды.

тиллированной воды, устанавливают pH 7,3 ± 0,2, разливают в пробирки по 5—7 $см^3$ и стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин.

5.2.11. Среды Гисса с маннитом, рамнозой, ксилозой: 10 г пептона ферментативного и 5 г натрия хлористого растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды и добавляют 10 г соответствующего углевода. Устанавливают pH 7,1 ± 0,1, вносят 10 мл индикатора Андреде (также возможно использование индикатора бромкрезолового пурпурного, «ВР» и др.), разливают в пробирки и стерилизуют при 112 °С в течение 20 мин.

5.2.12. Среда для определения лецитиназной активности листерий. К среде ГРМ № 1 перед стерилизацией добавляют активированный уголь, растертый до порошкообразного состояния, до концентрации 0,5 % (вес/объем). Желток куриного яйца разводят в 150 мл физиологического раствора и добавляют 5 % по объему к стерилизованной и охлажденной до 40—50 °С среде. Разливают в чашки Петри по 10 $см^3$ и подсушивают при 37 °С. Аналогично готовят среду без активированного угля.

5.3. Подготовка к проведению твердофазного гибридизационного ДНК-рРНК анализа

5.3.1. Все реагенты наборов перед использованием необходимо прогреть при комнатной температуре в течение 30 мин, перед использованием содержимое флаконов необходимо аккуратно перемешать легким переворачиванием флакона. Пробирки с сенсибилизированными олигонуклеотидными ДНК-зондами извлекают из упаковки в количестве, соответствующем общему числу исследуемых и контрольных проб.

5.3.2. Перед началом работы необходимо проверить индикаторы уровня влажности: индикаторная полоска на пакетах с сорбентом должна иметь синий цвет, при высокой влажности она приобретает розовую окраску, что говорит о непригодности к использованию пробирок, находящихся в данном комплекте наборов.

5.3.3. Приготовление промывочного буфера: 1 флакон, содержащий 30 мл концентрированного (х20) промывочного буфера, вносят в 570 $см^3$ свежеприготовленной стерильной дистиллированной воды (или 1 объем концентрированного буфера на 19 объемов стерильной дистиллированной воды). Приготовление буфера рекомендуется проводить в мерном цилиндре: сначала количественно переносят содержимое флакона с концентрированным буфером, после чего постепенно по стенке цилиндра вливают дистиллированную воду, доводя общий объем до 600 $см^3$, и тщательно перемешивают, избегая образования пены на поверхности смеси. Хранение готового буфера: 1 месяц при комнатной температуре.

Примечания.

Содержимое гибридизационного буфера является едким веществом и не должно попадать в глаза и на кожу. В случае контакта немедленно обильно промыть и обратиться к врачу.

При проведении анализа необходимо надеть защитную одежду и перчатки.

Большинство реагентов содержат азид натрия в качестве консерванта.

6. Отбор и подготовка проб к анализу

6.1. Отбор и подготовку проб продукции производят в соответствии с ГОСТ 26668—85 «Методы отбора проб для микробиологических анализов», ГОСТ 26669—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов», МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов», ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218—96), ГОСТ Р 51921—02 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes», МУК 4.2.1122—02 «Организация контроля и методы выявления бак-

терий Listeria monocytogenes в пищевых продуктах», а также в соответствии с действующими ГОСТ и НД на конкретные виды продуктов (п.п. 10.8—10.14).

6.2. Масса или объем отбираемых проб должны быть достаточными для проведения исследования и минимально вдвое превышать аналитический образец. Из точечных проб составляют навеску массой (25 ± 0,1) г (50—100 г – для продуктов детского, лечебного и специализированного питания).

6.3. От продукции в потребительской таре в мелкой фасовке пробы отбирают в количестве одной или нескольких единиц в зависимости от массы или объема потребительской тары, с тем чтобы количество было достаточным для проведения анализа.

6.4. От продукции в транспортной или потребительской таре больших размеров или неупакованной пробы отбирают из разных мест с различной глубины, включая поверхность.

6.5. Для микробиологических анализов пробы отбирают до взятия проб на физико-химические и органолептические анализы стерильным инструментом в стерильную посуду. При этом от образца отбирают несколько точечных проб из разных мест, которые измельчают и перемешивают, из них составляют навеску 25 г.

6.6. Замороженные продукты предварительно размораживают до температуры внутри продукта 0—(–1)°С (не менее 1 ч в термостате при температуре 37 °С); продукты, содержащие жиры (сливочное масло, мороженое), нагревают до температуры 40—45 °С и перемешивают.

6.7. Отобранные образцы перемешивают и измельчают или доводят до однородной консистенции по ГОСТ 26669—85, из измельченной суспензии составляют навеску необходимой массы.

6.8. При посевах высококислотных или щелочных (с pH < 6 или > 7,5) жидких и твердых продуктов для предотвращения снижения pH питательных сред на 0,5 и более, pH продукта перед посевом доводят до 7,0 ± 0,2 по ГОСТ 30519—97 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella».

6.9. Смывы отбирают с помощью стерильных увлажненных тампонов, сделанных из марли или ваты, с поверхности оборудования и инвентаря площадью 100 $см^2$, используя трафарет. Трафарет фламбируют перед каждым употреблением.

7. Проведение анализа по подтверждению принадлежности бактерий рода Listeria к виду L. monocytogenes

7.1. Первичный посев исследуемых проб пищевых продуктов проводят в соответствии с процедурой, изложенной в разделах 6.1—6.4 МУК 4.2.1122—02 или ГОСТ Р 51921—02.

7.2. Смывы с поверхности оборудования или инвентаря в количестве 2 $см^3$ вносят в бульон Фрейзера половинной концентрации в соотношении 1 : 9 по объему. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

7.2.1. После термостатирования проб в среде для первичного накопления 0,1 $см^3$ суспензии пересевают в 10 $см^3$ бульона Фрейзера для вторичного обогащения. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

7.2.2. Из пробирок после термостатирования, независимо от наличия или отсутствия признаков роста, и в т. ч. почернения, делают пересев по 0,1 $см^3$ на поверхность двух чашек Петри с одной из агаризованных дифференциально-диагностических сред – ПАЛКАМ-агара или Оксфорд-агара (п.п. 5.2.6, 5.2.7). Посевной материал растирают стерильным шпателем. Допускается проводить пересев петлей штрихом. Чашки со средами предварительно подсушивают.

Посевы термостатируют при температуре (37±1) °С в течение 24—48 ч.

7.2.3. При отсутствии роста на чашках с дифференциально-диагностическими средами типа Оксфорд-агара или PALCAM-агара анализ прекращают и дают заключение об отсутствии L. monocytogenes в исследованной пробе смыва с поверхности оборудования или инвентаря.

7.3. При обнаружении характерного роста на чашках отбирают 3—5 колоний для их дальнейшего изучения.

На средах типа PALCAM-агара через 24 ч инкубирования листерии формируют мелкие, серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом, диаметром 0,5—1,0 мм, иногда с черным центром. Через 48 ч колонии диаметром 1,0—2,0 мм приобретают зеленую окраску с углубленными центрами, окруженными черным ореолом. Кокковая микрофлора (бактерии родов Staphylococcus, Enterococcus) образует желтые колонии за счет ферментации маннита.

На Оксфорд-агаре листерии, выращенные в течение 24 ч, формируют мелкие (1 мм), сероватые, окруженные черным ореолом колонии. Через 48 ч – более темные, около 2 мм в диаметре, с черным ореолом и углубленным центром.

При появлении сплошного роста листерии производят пересев бактериологической петлей из зон наибольшего почернения среды штрихами на 2—3 чашки Петри с селективной дифференциально-диагностической питательной средой (Оксфорд- или PALKAM-агар) для получения изолированных колоний. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч.

7.4. Отобранные для исследования 3—5 характерных колоний переносят в пробирку с 3 $см^3$ стерильного фосфатного буфера по п. 5.1.6. Содержимое пробирки тщательно перемешивают на гомогенизаторе типа «вортекс» для получения гомогенной суспензии клеток.

7.5. Концентрацию бактериальных клеток в растворе проверяют по оптическому стандарту Макфарланда, плотность суспензии должна составлять 1,5—2,0 ед. по шкале Макфарланда. Данный параметр измеряется либо визуально, либо денситометрически на приборах, откалиброванных также по шкале Макфарланда. При использовании отраслевого стандарта для визуальной оценки мутности № 10 ГИСК им. Л. А. Тарасевича расчетная концентрация клеток в пробе должна составлять не менее $10^7 см^3$.

7.6. При отсутствии оптических стандартов или денситометра допускается приготовление бактериальной суспензии путем внесения исследуемой культуры калиброванной (1 мкл) бактериологической петлей так, чтобы петля была полностью заполнена культурой, в пробирку с 0,5 $см^3$ стерильного фосфатного буфера. Содержимое пробирки тщательно перемешивают на гомогенизаторе типа «вортекс» для получения гомогенной суспензии.

7.7. Маркируют пробирки, входящие в набор «Lumiprobe 24 Listeria monocytogenes» в соответствии с номерами исследуемых проб и помещают в штатив для 12-миллиметровых пробирок с держателем. Не рекомендуется одновременно анализировать более 20 проб.

7.8. Внесение проб и всех реагентов (лизирующего и гибридизационного буферов, конъюгата, субстрата) необходимо производить быстро и не касаясь наконечником пипетки краев пробирки. Не допускается использование одного наконечника для внесения разных проб или растворов буферов.

7.9. Проведение лизиса бактериальных клеток: в каждую промаркированную пробирку добавляют, строго соблюдая очередность, как изложено ниже, следующие компоненты набора.

7.9.1. Лизирующий буфер в количестве 100 мкл.

7.9.2. Суспензию исследуемой культуры клеток в количестве 100 мкл.

В качестве отрицательного контроля (ОК) используют стерильный физиологический раствор – 100 мкл. В качестве положительного контроля (ПК) используют тест-культуру Listeria monocytogenes шт. 766, выращенную на ПАЛКАМ-агаре или Оксфорд-агаре при (37 ± 1) °С и подготовленную для исследования, как описано в п.п. 7.4, 7.5, также в количестве 100 мкл. В качестве положительного контроля могут использоваться другие референс-штаммы Listeria monocytogenes, типичные по фенотипическим и генотипическим свойствам.

7.9.3. Пробирки закрывают адгезивной уплотнительной защитной пленкой (из набора), быстро перемешивают и помещают для инкубирования в водяную баню при температуре (37 ± 1) °С на 15 мин.

7.10. Проведение гибридизации: вынимают штатив из водяной бани, удаляют защитную пленку и добавляют в каждую пробирку гибридизационный буфер по 250 мкл, закрывают пробирки новой защитной пленкой и интенсивно встряхивают. Пробирки с внесенным гибридизационным буфером инкубируют в водяной бане при температуре (50 ± 1) °С в течение 60 мин.

7.11. Выявление гибридов.

7.11.1. Снимают защитную пленку и быстро удаляют содержимое всех пробирок одновременно, не вынимая их из штатива, для чего штатив переворачивают и резко встряхивают.

7.11.2. Быстро заполняют каждую пробирку промывочным буфером (п. 5.3.3) в количестве 5 мл, используя диспенсер, после чего также быстро опустошают пробирки. Процедуру промывки проводят еще три раза. При проведении второй промывки также быстро полностью опустошают пробирки сразу после заполнения их промывочным буфером. Третий и четвертый раз промывают пробирки следующим образом: после заполнения пробирок промывочным буфером ждут 30 с перед тем как полностью их опустошить.

Порядок заполнения пробирок промывочным буфером: первую и третью промывки начинают с 1-й в ряду пробирки, вторую и четвертую промывки – с последней.

После четвертой промывки содержимое пробирок энергично сливают в раковину, переворачивают штатив с пробирками и помещают на фильтровальную бумагу, слегка встряхивая до тех пор, пока пробирки не осушатся (4—5 раз), и оставляют их в перевернутом состоянии на несколько секунд.

7.11.3. Во все пробирки вносят раствор конъюгата по 100 мкл. Покрывают пробирки новой уплотняющей защитной пленкой и сильно встряхивают штатив. Инкубируют в водяной бане при (37 ± 1) °С в течение 15 мин. Штатив вынимают из водяной бани, удаляют защитную пленку и быстро выливают содержимое всех пробирок одновременно, не вынимая их из штатива.

7.11.4. Пробирки промывают 4 раза, выдерживая каждый раз не менее 30 с (для этого быстро опустошают пробирки и затем полностью заполняют их промывочным буфером). Следует обратить внимание на то, что, промывая пробирки в четвертый раз, буфер необходимо вносить медленно, не допуская образования пены, а после его удаления на стенках пробирок не должно оставаться пены от промывочного буфера (пробирки должны быть абсолютно прозрачными).

По окончании промывки пробирки помещают на фильтровальную бумагу и оставляют в перевернутом состоянии несколько секунд, пока они полностью не осушатся.

7.11.5. Во все пробирки вносят раствор субстрата по 100 мкл и осторожно встряхивают. Инкубируют в темноте при температуре не выше 20—22 °С в течение 15 мин. Для внесения раствора субстрата следует пользоваться отдельной пипеткой для предотвращения его контаминации.

7.11.6. Измеряют уровень хемилюминесценции в каждой пробирке на люминометре «Люмлайт» или «Люмлайт мини» с интеграционным временем 5 с в соответствии с инструкцией к прибору.

Перед измерением каждую пробирку осторожно протирают для удаления капель жидкости. Следует обратить внимание, что во время измерения хемилюминесценции в пробирочном люминометре прибор не должен находиться под прямым источником света.

Примечания.

Стадия гибридизации должна начинаться не позднее 45 мин после стадии лизиса.

Качество гибридизации и фиксации конъюгата зависят от времени и температуры инкубации, которые необходимо строго соблюдать

7.12. Учет результатов. Результат измерения величины хемилюминесценции в пробах выражают в относительных люминесцирующих единицах за секунду (ОЛЕ/с).

Пороговая величина (отсекающее значение) определяется как уровень хемилюминесценции пробы в отрицательном контроле (ОК), умноженный на коэффициент (или «Cut-off» фактор), равный 10.

Уровень пороговой величины измерения в данном варианте анализа не должен превышать 20 000 ОЛЕ/с.

Если отрицательный контроль дает более высокое значение величины ОЛЕ/с, следует провести тестирование раствора субстрата: 100 мкл инкубировать при комнатной температуре 15 мин и прочитать показания с помощью люминометра.

7.12.1. Интерпретация полученных результатов: результат измерения считается положительным, если уровень хемилюминесценции в исследуемой пробе превышает уровень пороговой величины измерения (отсекающего значения).

Результат измерения считается отрицательным, если уровень хемилюминесценции в исследуемой пробе ниже или равен уровню пороговой величины измерения (отсекающего значения).

Отрицательный результат измерения свидетельствует о том, что исследованный штамм не относится к виду Listeria monocytogenes; положительный результат свидетельствует о принадлежности выделенной культуры листерий к виду Listeria monocytogenes.

Примеры

В качестве примеров приводятся результаты исследования культур листерий, подвергнутых анализу в соответствии с п.п. 7.4—7.11, при значении отрицательного контроля 16 500 ОЛЕ/с. Величиной, от которой будет производиться отсчет (пороговая величина), в данном случае является: 16 500 х 10 («Cut-off» фактор) = 165 000 ОЛЕ/с. Результаты измерения уровней хемилюминесценции в пробах могут быть следующими.

Образцы культур	Уровень хемилюминесценции (ОЛЕ/с)	Интерпретация результатов
1	2	3
Тест-культура L. monocytogenes 766 (положительный контроль)	3 205 486	Результат положительный, культура относится к виду L. monocytogenes

Продолжение табл.

1	2	3
Тест-культура L. ivanovii	51 284	Результат отрицательный, культура не относится к виду L. monocytogenes
Тест-культура L. innocua	43 277	Результат отрицательный, культура не относится к виду L. monocytogenes
Культура, выделенная из исследуемого образца пищевого продукта	2 680 993	Результат положительный, культура относится к виду L. monocytogenes
Культура, выделенная из исследуемого образца смыва с поверхности оборудования	33 163	Результат отрицательный, культура не относится к виду L. monocytogenes

7.12.2. При получении положительного результата подтверждающего анализа с использованием набора «Lumiprobe 24 Listeria monocytogenes» дают заключение о выявлении Listeria monocytogenes в исследованной навеске (объеме) продукта или смывах с поверхности оборудования или инвентаря.

При получении отрицательного результата дают заключение об отсутствии Listeria monocytogenes в исследованной навеске (объеме) продукта или смывах с поверхности оборудования или инвентаря.

8. Проведение анализа по выявлению и определению бактерий рода Salmonella

8.1. Проведение экспрессного скринингового анализа по обнаружению бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах и смывах с поверхности оборудования и инвентаря

8.1.1. Подготовленную в соответствии с разделом 6 пробу исследуемого продукта (гомогената) или смыва с поверхности вносят в среду накопления – обогатительный бульон RM LP24 (п. 5.2.2), предварительно прогретый в течение 15 мин при температуре 45 °С, для первичного обогащения в соотношении 1 : 9 (25 г продукта в 225 $см^3$ среды, 2 $см^3$ смыва в 18 $см^3$ среды). При необходимости анализа других масс продукта их посев проводят в среду также в соотношении 1 : 9 по объему. Пробы гомогенизируют с использованием гомогенизаторов перистальтического типа или ножевых.

8.1.2. Гомогенизированную пробу в RM LP24 обогатительном бульоне термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 16—18 ч.

8.1.3. Переносят 1 $см^3$ инкубированной в RM LP24 обогатительном бульоне пробы в 100 мл селективного бульона RV (п. 5.2.3), предварительно нагретого до температуры 41,5 °С. Посевы инкубируют при температуре (41,5 ± 0,5) °С в течение 18—24 ч. После инкубирования пробы проводят высев на поверхность дифференциально-диагностических сред Плоскирева или Висмут-сульфитный агар.

8.1.4. Маркируют пробирки, входящие в набор «Lumiprobe 24 Salmonella» в соответствии с номерами исследуемых проб и помещают в штатив для 12-миллиметровых пробирок с держателем. Не рекомендуется одновременно анализировать более 20 проб.

8.1.5. Внесение проб и всех реагентов (лизирующего и гибридизационного буферов, конъюгата, субстрата) необходимо производить быстро и не касаясь наконечни-

ком краев пробирки. Не допускается использование одного наконечника для внесения разных проб или растворов буферов.

8.1.6. Проведение лизиса бактериальных клеток: в каждую промаркированную пробирку добавляют, строго соблюдая очередность, как изложено ниже, следующие компоненты набора.

8.1.6.1. Лизирующий буфер в количестве 100 мкл.

8.1.6.2. Исследуемую пробу в обогатительном бульоне RV в количестве 100 мкл.

В качестве отрицательного контроля (ОК) используют стерильный бульон RV – 100 мкл. Пробу стерильного бульона RV, используемого в качестве отрицательного контроля, термостатируют при температуре (41,5 ± 0,5) °С в течение 18—24 ч.

В качестве положительного контроля (ПК) используют тест-культуру Salmonella typhimurium, выращенную на бульоне RV при 41,5 °С, также в количестве 100 мкл. В качестве положительного контроля могут использоваться другие референс-штаммы рода Salmonella, типичные по серологическим и генотипическим свойствам.

8.1.6.3. Пробирки закрывают адгезивной уплотнительной защитной пленкой (из набора), быстро перемешивают и помещают для инкубирования в водяную баню при температуре (37 ± 1) °С на 15 мин.

8.1.7. Проведение гибридизации: вынимают штатив из водяной бани, удаляют защитную пленку и добавляют в каждую пробирку гибридизационный буфер по 300 мкл, закрывают пробирки новой защитной пленкой и интенсивно встряхивают. Пробирки с внесенным гибридизационным буфером инкубируют в водяной бане при температуре (37 ± 1) °С в течение 60 мин.

8.1.8. Выявление гибридов

8.1.8.1. Удаляют защитную пленку и быстро выливают содержимое всех пробирок одновременно, не вынимая их из штатива.

8.1.8.2. Не вынимая из штатива, быстро заполняют каждую пробирку промывочным буфером (п. 5.3.3) в количестве 5 $см^3$, используя диспенсер, после чего быстро опустошают пробирки. Процедуру промывки проводят еще три раза. При проведении второй промывки также быстро полностью опустошают пробирки сразу после заполнения их промывочным буфером. Третий и четвертый раз промывают пробирки следующим образом: после заполнения пробирок промывочным буфером ждут 30 с перед тем как полностью их опустошить.

Порядок заполнения пробирок промывочным буфером: первую и третью промывки начинают с 1-й пробирки, вторую и четвертую промывки – с последней.

После четвертой промывки содержимое пробирок энергично сливают в раковину, переворачивают штатив с пробирками и помещают на фильтровальную бумагу, слегка встряхивая до тех пор, пока пробирки не осушатся (4—5 раз), и оставляют их в перевернутом состоянии на несколько секунд.

8.1.8.3. Во все пробирки вносят раствор конъюгата по 100 мкл. Покрывают пробирки новой уплотняющей защитной пленкой и сильно встряхивают штатив. Инкубируют в водяной бане при (37 ± 1) °С в течение 25 мин. Штатив вынимают из водяной бани, удаляют защитную пленку и быстро выливают содержимое всех пробирок одновременно, не вынимая их из штатива.

8.1.8.4. Пробирки промывают 4 раза, выдерживая каждый раз не менее 30 с (для этого быстро опустошают пробирки и затем полностью заполняют их промывочным буфером). Следует обратить внимание на то, что, промывая пробирки в четвертый раз, буфер необходимо вносить медленно, не допуская образования пены, а после его удаления пробирки должны быть абсолютно прозрачными.

По окончании промывки пробирки помещают на фильтровальную бумагу и оставляют в перевернутом состоянии несколько секунд, пока пробирки полностью не осушатся.

8.1.8.5. Во все пробирки вносят раствор субстрата по 100 мкл и осторожно встряхивают. Инкубируют в темноте при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 15 мин. Для внесения раствора субстрата следует пользоваться отдельной пипеткой для предотвращения его контаминации.

8.1.9. Измеряют уровень хемилюминесценции в каждой пробирке на люминометре «Люмлайт» или «Люмлайт мини» с интеграционным временем 5 с в соответствии с инструкцией к прибору.

Перед измерением каждую пробирку осторожно протирают для удаления капель жидкости. Во время измерения хемилюминесценции прибор не должен находиться под прямым источником света.

Примечания.

Стадия гибридизации должна начинаться не позднее 45 мин после стадии лизиса.

Качество гибридизации и фиксации конъюгата зависят от времени и температуры инкубации, которые необходимо строго соблюдать.

Низкий уровень pH (< 5) в обогатительном бульоне после внесения высококислотных продуктов (фруктовые соки, кисло-молочные продукты и др.) может приводить к ложноотрицательным результатам; необходимо нейтрализовать пробы (раздел 6).

8.1.10. Учет результатов

Результат прямого измерения хемилюминесценции в пробах выражают в относительных люминесцирующих единицах в секунду (ОЛЕ/с).

Пороговая величина (отсекающее значение) определяется как уровень хемилюминесценции пробы с отрицательным контролем (ОК), умноженный на коэффициент 2 («Cut-off» фактор).

8.1.10.1. Интерпретация полученных результатов: результат измерения считается положительным, если уровень хемилюминесценции в исследуемой пробе превышает уровень пороговой величины измерения (отсекающего значения).

Результат измерения считается отрицательным, если уровень хемилюминесценции в исследуемой пробе ниже или равен уровню пороговой величины измерения (отсекающего значения).

Примеры

В качестве примеров приводятся результаты исследования проб, подвергнутых анализу в соответствии с п.п. 8.1.1—8.1.9, при значении отрицательного контроля 14 600 ОЛЕ/с. Величиной, от которой будет производиться отсчет (пороговая величина), в данном случае является: 14 600 х 2 («Cut-off» фактор) = 29 200 ОЛЕ/с. Результаты измерения уровней хемилюминесценции в пробах могут быть следующими.

Исследуемые пробы	Уровень хемилюминесценции (ОЛЕ/с)	Интерпретация результатов
1	2	3
Тест-культура Salmonella typhimurium, выращенная на бульоне RV (положительный контроль)	4 084 823	Результат положительный, в исследованной пробе присутствуют бактерии рода Salmonella

Продолжение табл.

1	2	3
Проба исследуемого пищевого продукта	20 350	Результат отрицательный, в исследованной пробе отсутствуют бактерии рода Salmonella
Проба исследуемого смыва с поверхности оборудования	7 588 609	Результат положительный, в исследованной пробе присутствуют бактерии рода Salmonella

8.1.10.2. При получении положительного результата его подтверждение проводят в соответствии с ГОСТ 30519—97 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella» путем выделения чистой культуры из среды RV на селективных агаризованных средах (висмут-сульфитный агар, агар Плоскирева), постановки реакции агглютинации с поливалентными сальмонеллезными сыворотками и биохимического подтверждения принадлежности выделенных характерных колоний к бактериям рода Salmonella. Допускается использование биохимических тест-систем API 20E или Rapid 20E для ускоренной идентификации энтеробактерий (ф. «BioMerieux»).

8.1.11. Результаты оценивают по каждой исследованной пробе отдельно.

К бактериям рода Salmonella относят культуры, имеющие характерные признаки роста на дифференциально-диагностических средах, интерпретированные как положительные в тесте с использованием набора «Lumiprobe 24 Salmonella» и показавшие типичные биохимические и серологические реакции.

8.1.11.1. Результаты выявления бактерий рода Salmonella в определенной навеске продукта записывают: «Бактерии рода Salmonella обнаружены в 25 г ($см^3$), в 50—100 г – для продуктов детского или диетического питания, или в 2 $см^3$ смыва».

8.1.11.2. При получении отрицательного результата дают заключение об отсутствии бактерий рода Salmonella в исследованной пробе продукта или смывах с поверхности оборудования или инвентаря.

8.2. Проведение анализа по подтверждению принадлежности выделенных культур к роду Salmonella

8.2.1. Первичный посев исследуемых проб пищевых продуктов и пересев из неселективных и селективных сред обогащения проводят в соответствии с ГОСТ 30519—97 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella» или МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов», другими методическими документами, утвержденными в установленном порядке.

8.2.2. После термостатирования посевов отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Salmonella, на селективных дифференциально-диагностических средах:

- Плоскирева – колонии сальмонелл бесцветные, прозрачные, плоские;
- Висмут-сульфитный агар – колонии черные с характерным металлическим блеском и пигментированием среды под колониями, а также зеленоватые с темным ободком.

8.2.3. При наличии на дифференциально-диагностических средах колоний, характерных для бактерий рода Salmonella, проводят их подтверждение с использованием набора «Lumiprobe 24 Salmonella».

8.2.4. Отобранные для исследования 3—5 характерных колоний переносят в пробирку с 3 $см^3$ стерильного фосфатного буфера по п. 5.1.6. Содержимое пробирки

тщательно перемешивают на гомогенизаторе типа «вортекс» для получения гомогенной суспензии клеток.

8.2.5. Концентрацию бактериальных клеток в растворе проверяют по оптическому стандарту Макфарланда, плотность суспензии должна составлять не менее 1,5—2,0 ед. по шкале Макфарланда. Данный параметр измеряется либо визуально, либо денситометрически на приборах, откалиброванных также по шкале Макфарланда. При использовании отраслевого стандарта для визуальной оценки мутности № 10 ГИСК им. Л. А. Тарасевича расчетная концентрация клеток в пробе должна составлять не менее $10^7 см^3$.

8.2.6. При отсутствии оптических стандартов или денситометра допускается приготовление бактериальной суспензии путем внесения исследуемой культуры, калиброванной (1 мкл) бактериологической петлей так, чтобы петля была полностью заполнена культурой, в пробирку с 0,5 $см^3$ стерильного фосфатного буфера. Содержимое пробирки тщательно перемешивают на гомогенизаторе типа «вортекс» для получения гомогенной суспензии.

8.2.7. Маркируют пробирки, входящие в набор «Lumiprobe 24 Salmonella», в соответствии с номерами исследуемых проб и помещают в штатив с держателем. Не рекомендуется одновременно анализировать более 20 проб.

8.2.8. Далее проведение гибридизационного ДНК-РНК анализа культур, подозрительных на принадлежность роду Salmonella, осуществляют в соответствии с разделами 8.1.5—8.1.9.

8.2.9. Учет результатов. Результат прямого измерения хемилюминесценции в пробах выражают в относительных люминесцирующих единицах (ОЛЕ)/с.

Пороговая величина (отсекающее значение) определяется как уровень хемилюминесценции пробы с отрицательным контролем (ОК) х 10 («Cut-off» фактор).

8.2.9.1. Интерпретация полученных результатов: результат измерения считается положительным, если уровень хемилюминесценции в исследуемой пробе превышает уровень пороговой величины измерения (отсекающего значения).

Результат измерения считается отрицательным, если уровень хемилюминесценции в исследуемой пробе ниже или равен уровню пороговой величины измерения (отсекающего значения).

8.2.9.2. В случае положительного результата анализа с использованием набора «Lumiprobe 24 Salmonella» проводится биохимическое и серологическое подтверждение принадлежности выделенных характерных колоний к бактериям рода Salmonella в соответствии с ГОСТ Р 50480—93 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella» или МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов».

8.2.9.3. К бактериям рода Salmonella относят культуры, имеющие характерные признаки роста на дифференциально-диагностических средах, интерпретированные как положительные в тесте с использованием набора «Lumiprobe 24 Salmonella» и показавшие типичные биохимические и серологические реакции.

8.2.9.4. Отрицательный результат измерения свидетельствует о том, что исследованный штамм не относится к роду Salmonella.

9. Требования безопасности

Исследования пищевых продуктов на наличие Listeria monocytogenes и Salmonella проводят в соответствии с СанПиН 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

10. Нормативные ссылки

1. ГОСТ 30519—97 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella».

2. ГОСТ Р 51921—02 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes».

3. ГОСТ Р 51446—99 (ИСО 7218—96) «Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

4. ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических исследований».

5. ГОСТ 26669—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

6. ГОСТ 26670—91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов».

7. ГОСТ 10444.1—84 «Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

8. ГОСТ 9225—84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа».

9. ГОСТ 9792—73 «Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб».

10. ГОСТ 9958—81 «Изделия колбасные и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа».

11. ГОСТ 4288—76 «Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса. Правила приемки и методы испытания».

12. ГОСТ 7631—85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний».

13. «Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях». М., 1990.

14. «Инструкция по микробиологическому контролю быстрозамороженной плодоовощной продукции» (утв. Госагропромом СССР; согл. Минздравом СССР 29.09.89).

15. СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

16. СанПиН 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

17. МУК 4.2.1122—02 «Организация контроля и методы выявления бактерий Listeria monocytogenes в пищевых продуктах».

18. МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов».

gost.e-ecolog.ru