Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственная система
санитарно–эпидемиологического
нормирования Российской Федерации

БЮЛЛЕТЕНЬ

НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ

ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

МОСКВА — 2004

Год издания 5-й

Выпуск 1 (15)
Март

gost.e-ecolog.ru

ISBN 5—7508—0247—7

БЮЛЛЕТЕНЬ

НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ

ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

Выпуск 1 (15), март 2004
Издается с 2000 г.

НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Зарегистрирован Министерством Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций

Номер регистрационного свидетельства 77—1525

Подписано в печать 12.03.04

Формат 60×88/8, печ. л. 18,0, заказ 6457, тираж 1500 экз.

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати Издательским отделом Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11
Отделение реализации, тел./факс 198-6101

Отпечатано в филиале Государственного ордена Октябрьской Революции, ордена Трудового Красного Знамени Московского предприятия «Первая Образцовая типография» Министерства Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций
113114, Москва, Шлюзовая наб., 10, тел. 235-2030

© Минздрав России, 2004
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004

УЧРЕДИТЕЛИ

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральный центр госсанэпиднадзора Министерства здравоохранения Российской Федерации

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Г. Г. Онищенко

Е. Н. Беляев,
С. И. Иванов,
Л. П. Гульченко,
М. П. Шевырева,
Н. В. Шестопалов,
С. С. Перель,
Г. Ф. Лазикова,
Т. Я. Пожидаева,
А. И. Петухов,
Г. С. Перминова,
В. И. Чибураев

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Х. Агиров (Майкоп),
Г. В. Айдинов (Ростов-на-Дону),
В. А. Алешкин (Москва),
А. А. Баранов (Москва),
Н. Н. Верещагин (Оренбург),
С. Д. Волков (Москва),
А. Л. Гинцбург (Москва),
В. В. Губернаторова (Иваново),
В. И. Евдокимов (Белгород),
И. Я. Егоров (Якутск),
Н. А. Забродин (Ижевск),
А. И. Заиченко (Москва),
Н. Ф. Измеров (Москва),
Э. Б. Коваленко (Московская область),
И. В. Корабельников (Сыктывкар),
С. В. Куркатов (Красноярск),
В. И. Курчанов (Санкт-Петербург),
Г. И. Куценко (Москва),
В. Р. Кучма (Москва),
Б. В. Лимин (Вологда),
И. Н. Малеванный (Санкт-Петербург),
Н. П. Мамчик (Воронеж),
Г. Д. Минин (Уфа),
Б. И. Никонов (Екатеринбург),
В. И. Покровский (Москва),
А. И. Потапов (Москва),
Ю. А. Рахманин (Москва),
С. И. Савельев (Липецк),
И. П. Салдан (Барнаул),
В. Р. Саухат (Магадан),
В. П. Сергиев (Москва),
А. М. Спиридонов (Самара),
В. А. Тутельян (Москва),
Н. Н. Филатов (Москва),
В. П. Чащин (Санкт-Петербург),
Б. Л. Черкасский (Москва),
М. И. Чубирко (Воронеж),
М. Г. Шандала (Москва)

Подписка на *Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора* принимается во всех почтовых отделениях России. Подписной индекс в каталоге *Издания органов НТИ* – **66680**; в каталоге *Газеты и журналы* – **79682**; годовой – **79683**

Адрес редакции:
125167, Москва, пр. Аэропорта, 11
Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России

Тел. 195-9597, факс 198-6101

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ

Перечень основных действующих нормативных и методических документов по коммунальной гигиене 3

Перечень основных действующих нормативных и методических документов по гигиене питания 17

Гигиенические нормативы «Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.1338—03» ГН 2.1.6.1765—03 29

Гигиенические нормативы «Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.1339—03» ГН 2.1.6.1764—03 37

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Методические указания «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов» МУ 2.3.2.1830—04 45

Методические указания «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности» МУ 1.3.1794—03 91

Методические указания «Санитарно-паразитологическая оценка эффективности обеззараживания воды ультрафиолетовым излучением» МУ 3.2.1757—03 123

Методические указания «Санитарно-эпидемиологическая оценка и эксплуатация аэроионизирующего оборудования» МУ 4.3.1517—03 133

Перечень
основных действующих нормативных и методических документов по коммунальной гигиене

Министерство здравоохранения Российской Федерации

127994, ГСП-4, Москва,
Рахмановский пер., 3,
телеграф: 485042,
телетайп № 485042,
факс: 504-44-46,
e-mail: gost.e-ecolog.ru
21.01.04, № 2510/493-04-32

Главным врачам Центров госсанэпиднадзора в субъектах Российской Федерации, регионов, на транспорте (водном и воздушном)

На № _____

О действующих нормативных и методических документах по коммунальной гигиене

Направляю для сведения и использования в работе «Перечень основных действующих нормативных и методических документов по коммунальной гигиене» по состоянию на 1 июля 2003 года.

В соответствии с законодательством Российской Федерации на территории Российской Федерации действуют санитарные правила, нормы и гигиенический нормативы, утвержденные бывшим Министерством здравоохранения СССР, в части, не противоречащей санитарному законодательству Российской Федерации, бывшим Госкомсанэпиднадзором России, а также действуют документы, утвержденные Минздравом России.

Указанные документы действуют впредь до отмены, либо принятия новых нормативных правовых актов взамен существующих.

Первый заместитель Министра здравоохранения, Главный государственный санитарный врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

Подготовлен Департаментом госсанэпиднадзора Минздрава России (Т. Я. Пожидаева, А. П. Веселов, Б. Г. Бокитько), Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (М. К. Недогибченко, Н. Д. Антипова, Б. М. Кудрявцева, Н. А. Николаева).

Содержание

Раздел 2. Гигиена 6

Группа 2.1. Коммунальная гигиена 6

2.1.1. Планировка и застройка населенных мест 6

2.1.2. Проектирование, строительство и эксплуатация жилых зданий, предприятий коммунально-бытового обслуживания, учреждений образования, культуры, отдыха, спорта 6

2.1.3. Медицинские учреждения 7

2.1.4. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест 7

2.1.5. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водоемов 9

2.1.6. Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений, санитарная охрана воздуха 11

2.1.7. Почва, очистка населенных мест, отходы производства и потребления, санитарная охрана почвы 12

2.1.8. Физические факторы окружающей природной среды 13

2.1.9. Товары бытового назначения, полимерные материалы и изделия 15

№ п/п	Наименование документа	Регистрационный номер
1	2	3
Раздел 2. Гигиена **Группа 2.1. Коммунальная гигиена**		
2.1.1. Планировка и застройка населенных мест		
1	Санитарные правила и нормативы «Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов»	СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200—03
2	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к размещению, устройству и содержанию кладбищ, зданий и сооружений похоронного назначения»	СанПиН 2.1.1279—03
3	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению общественных и жилых зданий»	СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278—03
4	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к инсоляции и солнцезащите помещений жилых и общественных зданий и территорий»	СанПиН 2.2.1/2.1.1.1076—01
5	Санитарные правила к проектированию, строительству и эксплуатации труднодоступных гидрометеорологических станций системы Госкомгидромета	3898—85
6	Методические указания по осуществлению госсаннадзора за разработкой и реализацией генеральных планов города	1434а—76
7	Методические указания по осуществлению госсаннадзора за планировкой сельских населенных пунктов	2943—83
2.1.2. Проектирование, строительство и эксплуатация жилых зданий, предприятий коммунально-бытового обслуживания, учреждений образования, культуры, отдыха, спорта		
8	Санитарные правила и нормативы «Санитарно-эпидемиологические требования к жилым зданиям и помещениям»	СанПиН 2.1.2.1002—00
9	Санитарные правила и нормы «Устройство, оборудование и содержание центров временного размещения иммигрантов-иностранных граждан, лиц без гражданства и беженцев»	СанПиН 2.1.2/3.041—96
10	Санитарные правила устройства, оборудования и содержания общежитий для рабочих, студентов, учащихся средних специальных учебных заведений и профессионально-технических училищ	4719—88
11	Санитарные правила и нормативы «Парикмахерские. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию»	СанПиН 2.1.2.1199—03
12	Санитарные правила устройства и содержания косметических кабинетов при учреждениях коммунального и бытового обслуживания населения	1163—74
13	Санитарные правила устройства, оборудования и содержания бань	982—72

Продолжение

1	2	3
14	Санитарные правила устройства, оборудования и содержания прачечных	979—72
15	Санитарные правила и нормативы «Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды плавательных бассейнов. Контроль качества»	СанПиН 2.1.2.1188—03
16	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к устройству, оборудованию, эксплуатации и качеству воды аквапарков»	СанПиН 2.1.2.1331—03
17	Санитарные правила устройства и содержания мест занятий по физической культуре и спорту	1567—76
18	Временные санитарные правила устройства и содержания альпинистских лагерей	958—78
19	Санитарно-гигиенические требования для проектирования, строительства и эксплуатации русской бани «Суховей»	2559—82
20	Санитарные правила устройства и содержания общественных уборных	983—72
21	Санитарные правила устройства, оборудования и содержания экспериментально-биологических клиник (виварием)	1045—73
22	Методические указания по гигиеническому контролю за проектированием, строительством и эксплуатацией ВУЗов	2164—80
23	Временные методические указания по преднадзору за организацией загородного кратковременного отдыха населения крупных и крупнейших городов	2815—83
	2.1.3. Медицинские учреждения	
24	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к размещению, устройству, оборудованию и эксплуатации больниц, родильных домов и других лечебных стационаров»	СанПиН 2.1.3.1375—03
25	Лечебные пляжи. Санитарные правила устройства, оборудования и эксплуатации	4060—85
26	Санитарные правила устройства, оборудования, эксплуатации амбулаторно-поликлинических учреждений стоматологического профиля, охраны труда и личной гигиены персонала	2956а—83
27	Санитарные правила устройства и эксплуатации отделений (кабинетов) для отпуска внутренних не питьевых бальнеотерапевтических процедур	1234—75
28	Инструкция по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)	309—97
29	Санитарные правила и нормы «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений»	СанПиН 2.1.7.728—99
	2.1.4. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест	
30	Санитарные правила и нормативы «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества»	СанПиН 2.1.4.1074—01

Продолжение

1	2	3
31	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников»	СанПиН 2.1.4.1175—02
32	Санитарные правила и нормативы «Зоны санитарной охраны источников водоснабжения и водопроводов питьевого назначения»	СанПиН 2.1.4.1110—02
33	Санитарные правила «Зоны санитарной охраны источников питьевого водоснабжения г. Москвы»	СП 2.1.4.1075—01
34	Санитарные правила по устройству и эксплуатации водозаборов с системой искусственного пополнения подземных вод хозяйственно-питьевого назначения	1974—79
35	Санитарные правила проектирования, строительства и эксплуатации водохранилищ	3907—85
36	Санитарные правила устройства и эксплуатации систем центрального горячего водоснабжения	4723—88
37	Методические указания «Санитарный надзор за применением ультрафиолетового излучения в технологии подготовки питьевой воды»	МУ 2.1.4.719—98
38	Методические указания «Гигиеническая оценка материалов, реагентов, оборудования, технологий, используемых в системах водоснабжения»	МУ 2.1.4.783—99
39	Перечень материалов, реагентов и малогабаритных очистных устройств разрешенных Госкомсанэпиднадзором РФ для применения в практике хозяйственно-питьевого водоснабжения	01-19/32-11—92
40	«Перечень материалов, реагентов и малогабаритных очистных устройств, разрешенных для применения в практике хозяйственно-питьевого водоснабжения» Дополнение № 1 к перечню № 01-19/32-11 от 23.10.92	ДК – 285-111 от 25.12.98
41	Методические указания по осуществлению государственного санитарного надзора за фторированием питьевой воды	1834—78
42	Методические указания по гигиеническому контролю за проектированием, строительством и эксплуатацией групповых систем сельскохозяйственного водоснабжения	2058—79
43	Методические указания по санитарному контролю за применением и эксплуатацией электродиализных опреснительных установок	4044—85
44	Методические указания по санитарному надзору за применением и эксплуатацией ионообменных опреснительных установок в хозяйственно-питьевом водоснабжении	4045—85
45	Методические указания по санитарному контролю за применением и эксплуатацией обратноосмотических опреснительных установок	2261—80
46	Методические указания по санитарному контролю за применением и эксплуатацией гелиоопреснительных установок	4686—88

Продолжение

1	2	3
47	Методические указания по санитарному контролю за применением и эксплуатацией дистилляционных опреснительных установок	4687—88
48	Инструкция по контролю за обеззараживанием хозяйственно-питьевой воды и за дезинфекцией водопроводных сооружений хлором при централизованном и местном водоснабжении	723а—67
49	Санитарные правила и нормативы «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества»	СанПиН 2.1.4.1116—02
50	Методические указания по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116—02 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества»	МУ 2.1.4.1184—03
51	Методические указания «Санитарно-эпидемиологический надзор за использованием синтетических полиэлектролитов в практике питьевого водоснабжения»	МУ 2.1.4.1060—01
	2.1.5. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водоемов	
52	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к охране поверхностных вод»	СанПиН 2.1.5.980—00
53	Гигиенические нормативы «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования»	ГН 2.1.5.1315—03
54	Гигиенические нормативы «Ориентировочные допустимые уровни (ОДУ) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования»	ГН 2.1.5.1316—03
55	Методические указания по обоснованию гигиенических нормативов химических веществ в воде объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования	МУ 2.1.5.720—98
56	Санитарные правила «Гигиенические требования к охране подземных вод от загрязнения»	СП 2.1.5.1059—01
57	Санитарные правила и нормы «Санитарные правила и нормы охраны прибрежных вод морей от загрязнения в местах водопользования населения»	4631—88
58	Методические указания «Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод»	МУ 2.1.5.800—99
59	Методические указания «Санитарная оценка водных объектов при регистрационных испытаниях пестицидов, предназначенных для применения в сельском хозяйстве»	МУ 2.1.5.693—98
60	Методические указания «Использование ультрафиолетового излучения при обеззараживании воды плавательных бассейнов»	МУ 2.1.2.694—98

Продолжение

1	2	3
61	Методические указания «Санитарно-эпидемиологический надзор за обеззараживанием сточных вод ультрафиолетовым излучением»	МУ 2.1.5.732—99
62	Методические указания по рассмотрению проектов предельно допустимых сбросов (ПДС) веществ, поступающих в водные объекты со сточными водами	2875—83
63	Методические указания по гигиенической оценке использования доочищенных городских сточных вод в промышленном водоснабжении	3224—85
64	Методические указания «Санитарно-эпидемиологический надзор за использованием воды в системах технического водоснабжения промышленных предприятий»	МУ 2.1.5.1183—03
65	Методические указания по санитарной охране водоемов от загрязнения фенолами	1406—76
66	Методические указания по санитарной охране водоемов от загрязнения сточными водами заводов черной металлургии	1429—76
67	Методические указания по санитарной охране водоемов от загрязнения сточными водами предприятий угольной промышленности	1435—76
68	Методические указания по санитарной охране водоемов от загрязнения синтетическими поверхностно-активными веществами	1407—76
69	Методические указания по санитарной охране водоемов от загрязнения нефтью	1417—76
70	Методические указания по санитарной охране водоемов от загрязнения оловоорганическими соединениями	1816—77
71	Методические указания по применению расчетных экспресс-методов при гигиеническом нормировании химических соединений в воде водных объектов	1943—78
72	Методические указания по санитарной охране водоемов от загрязнения сточными водами целлюлозно-бумажной промышленности	1958а—78
73	Методические указания по изучению аллергенного действия при обосновании ПДК вредных веществ в воде водоемов	2185—80
74	Методические указания по изучению гонадотоксического действия химических веществ при гигиеническом нормировании в воде водоемов	2492—81
75	Методические указания по изучению эмбриотоксического действия химических веществ при гигиеническом обосновании их ПДК в воде водных объектов	2926—83
76	Методические указания к экспериментальному изучению процессов трансформации химических веществ при их гигиеническом регламентировании в воде	2966—84
77	Методические указания по изучению мутагенной активности веществ при обосновании их ПДК в воде	4110—86

Продолжение

1	2	3
2.1.6. Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений, санитарная охрана воздуха		
78	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к обеспечению качества атмосферного воздуха населенных мест»	СанПиН 2.1.6.1032—01
79	Гигиенические нормативы «ПДК загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест»	ГН 2.1.6.1338—03
80	Гигиенические нормативы «ОБУВ загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест»	ГН 2.1.6.1339—03
81	Гигиенические нормативы «Предельно допустимая концентрация (ПДК) полихлорированных дибензодиоксинов и полихлорированных дибензофуранов в атмосферном воздухе населенных мест»	ГН 2.1.6.014—94
82	Гигиенические нормативы «Предельно допустимая концентрация (ПДК) аверсектина в атмосферном воздухе населенных мест»	ГН 2.1.6.710—98
83	Гигиенические нормативы «Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест»	ГН 2.1.6.711—98
84	Гигиенические нормативы «Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест»	ГН 2.1.6.1003—00 (Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.711—98)
85	Гигиенические нормативы «Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест»	ГН 2.1.6.1004—01 (Дополнение № 2 к ГН 2.1.6.711—98)
86	Методические указания «Выбор базовых показателей для социально-гигиенического мониторинга (атмосферный воздух населенных мест)»	МУ 2.1.6.792—99
87	Временные методические указания по обоснованию предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест	4681—88
88	Методические указания по установлению ОБУВ для атмосферного воздуха	2630—82
89	Методические указания по гигиенической оценке предприятий угольной промышленности как источников загрязнения атмосферного воздуха	2290—81
90	Методические указания по организации контроля за содержанием канцерогенных полициклических ароматических углеводородов в атмосферном воздухе населенных мест	4440—87
91	Методические указания по гигиенической оценке предприятий промышленности огнеупорных материалов как источников загрязнения атмосферного воздуха	2294—81
92	Методические указания по санитарной охране атмосферного воздуха в районах размещения предприятий нефтеперерабатывающей и нефтехимической промышленности	2656—82

Продолжение

1	2	3
93	Методические указания по осуществлению санитарного надзора за выполнением мероприятий по охране окружающей среды на тепловых электростанциях (ТЭС)	2265—79
94	Методические указания по определению степени загрязнения атмосферного воздуха и ее оценке	2297а—81
	2.1.7. Почва, очистка населенных мест, отходы производства и потребления, санитарная охрана почвы	
95	Санитарные правила и нормативы «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы»	СанПиН 2.1.7.1287—03
96	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления»	СанПиН 2.1.7.1322—03
97	Санитарные правила устройства и содержания сливных станций	1216—75
98	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к устройству и содержанию полигонов для твердых бытовых отходов»	СанПиН 2.1.7.1038—01
99	Санитарные правила и нормы «Санитарные правила содержания территории населенных мест»	4690—88
100	Санитарные правила по сбору, хранению, транспортировке и первичной обработке вторичного сырья	2524—82
101	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к хранению, применению и транспортировке пестицидов и агрохимикатов»	СанПиН 1.2.1077—01
102	Методические указания «Определение органических веществ в почве и отходах производства и потребления»	МУК 4.1.1061—4.1.1062—01
103	Санитарные правила и нормы «Гигиенические требования к использованию сточных вод и осадков для орошения и удобрения»	СанПиН 2.1.7.573—96
104	Предельно допустимые концентрации (ПДК) и ориентировочно допустимые количества (ОДК) химических веществ в почве	6229—91 Ч.1 (без пестицидов)
105	Гигиенические нормативы «Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) тяжелых металлов и мышьяка в почвах». Дополнение № 1 к перечню ПДК и ОДК № 6229—91	ГН 2.1.7.020—94
106	Гигиенические нормативы «Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды»	ГН 1.2.1323—03
107	Предельное содержание токсичных соединений в промышленных отходах в накопителях, расположенных вне территории предприятия (организации)	4015—85
108	Санитарные правила установления класса опасности токсических отходов производства и потребления	СП 2.1.7.1386—03
109	Методические указания «Сбор, транспортирование, захоронение асбестосодержащих отходов»	МУ 2.1.7.1185—03
110	Методические указания «Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест»	МУ 2.1.7.730—99

Продолжение

1	2	3
111	Методические указания по осуществлению госсаннадзора за проектированием, строительством и эксплуатацией сооружений по очистке сточных вод птицефабрик	1230—75
112	Ветеринарно-санитарные и гигиенические требования к устройству технологических линий удаления и утилизации навоза, получаемого на животноводческих комплексах и фермах	1896—78
113	Методические указания по осуществлению госсаннадзора за системами сбора, удаления, хранения, обеззараживания и использования навоза и навозных стоков животноводческих комплексов и ферм промышленного типа	2166—80
114	Инструкция о порядке уничтожения лекарственных средств	Утв. приказом Минздрава России от 15.12.02 № 382
115	Методические указания по применению математического моделирования для определения стойкости и нормирования фосфорорганических пестицидов в почве	2686—83
116	Методические указания для органов и учреждений санэпидслужбы по контролю за реализацией мероприятий, направленных на санитарную охрану окружающей среды от загрязнения твердыми бытовыми отходами	3912—85
117	Методические указания по осуществлению госсаннадзора за проектированием, строительством и эксплуатацией заводов биотермической переработки твердых отходов	2039—79
118	Временные методические указания по применению расчетного метода обоснования ОБУВ пестицидов в почве	2283—81
119	Санитарные правила по хранению, транспортировке и применению минеральных удобрений в сельском хозяйстве	1049—73
	2.1.8. Физические факторы окружающей природной среды	
120	Санитарные правила и нормы «Гигиенические требования при работах с источниками воздушного и контактного ультразвука промышленного, медицинского и бытового назначения»	СанПиН 2.2.4./2.1.8.582—96
121	Санитарные правила и нормы «Шум на рабочих местах, в помещениях жилых, общественных зданий и на территории жилой застройки»	СанПиН 2.2.4/2.1.8.562—96
122	Санитарные нормы допустимого шума, создаваемого изделиями медицинской техники в помещениях лечебно-профилактических учреждений	1204—87
123	Санитарные нормы допустимой громкости звучания звуковоспроизводящих и звукоусилительных устройств в закрытых помещениях и на открытых площадках	4396—87
124	Методические указания по гигиенической оценке производственной и непроизводственной шумовой нагрузки	МУ 4435—87
125	Методические указания по осуществлению госсаннадзора за мероприятиями по снижению шума при размещении взлетно-посадочных площадок малой авиации сельскохозяйственного назначения вблизи населенных пунктов	2683—83

Продолжение

1	2	3
126	Санитарные правила и нормы «Инфразвук на рабочих местах, в жилых и общественных помещениях и на территории жилой застройки»	СанПиН 2.2.4./2.1.8.583—96
127	Методические указания для органов и учреждений санитарно-эпидемиологической службы по контролю за выполнением «Санитарных норм допустимых уровней инфразвука и низкочастотного шума на территории жилой застройки»	4948—89
128	Санитарные правила и нормы «Производственная вибрация, вибрация в помещениях жилых и общественных зданий»	СанПиН 2.2.4./2.1.8.566—96
129	*Методические рекомендации по измерению и гигиенической оценке вибрации в жилых помещениях*	МУ 2957—84
130	Методические рекомендации по составлению карт вибрации жилой застройки	4158—86
131	Санитарные нормы и правила защиты населения от воздействия электрического поля, создаваемого воздушными линиями электропередачи переменного тока промышленной частоты	2971—84
132	Методические указания по определению электромагнитного поля воздушных высоковольтных линий электропередачи и гигиенические требования к их размещению	4109—86
133	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к размещению и эксплуатации передающих радиотехнических объектов»	СанПиН 2.1.8/2.2.4.1383—03
134	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к размещению и эксплуатации средств подвижной сухопутной радиосвязи»	СанПиН 2.1.8/2.2.4.1190—03
135	Методические указания «Определение уровней электромагнитного поля в местах размещения средств телевидения и ЧМ-радиовещания»	МУК 4.3.045—96 (кроме базовых станций)
136	Методические указания «Определение уровней электромагнитного поля в местах размещения передающих средств и объектов сухопутной подвижной радиосвязи СВЧ и УВЧ-диапазонов»	МУК 4.3.046—96 (кроме базовых станций)
137	Методические указания «Определение уровней магнитного поля в местах размещения передающих средств радиовещания и радиосвязи кило-, гекто-, и декаметрового диапазонов»	МУК 4.3.679—97
138	Предельно допустимые уровни плотности потока энергии, создаваемой микроволновыми печами	2666—83
139	Предельно допустимые уровни напряженности электромагнитного поля, создаваемого индукционными бытовыми печами, работающими на частоте 20—22кГц	2550—82
140	Санитарные нормы предельно допустимых уровней напряженности электромагнитного поля НЧ, СЧ, ВЧ и ОВЧ диапазонов, излучаемого радиосвязными средствами аэропортов гражданской авиации	4946—89

Продолжение

1	2	3
141	Методические указания по определению уровней электромагнитного поля средств управления воздушным движением гражданской авиации ВЧ, ОВЧ, УВЧ и СВЧ диапазонов	4550—88
142	Временный предельно допустимый уровень для населения плотности потока импульсно-прерывистой электромагнитной энергии 23 и 35 см диапазона, излучаемой обзорными радиолокаторами аэропортов с частотой вращения антенн не более 0,3 Гц	2814—83
143	Методические указания по определению и гигиенической регламентации электромагнитных полей, создаваемых береговыми и судовыми радиолокационными станциями	4258—87
144	Предельно допустимые уровни плотности потока электромагнитной энергии, создаваемой метеорологическими радиолокаторами 3 и 0,8 см диапазона в прерывистом режиме воздействия на население	2623—82
145	Предельно допустимый уровень плотности потока импульсной электромагнитной энергии, создаваемой метеорологическими радиолокаторами 17 см волн в прерывистом режиме воздействия на населения	2958—84
146	Информационное письмо о размерах санитарно-защитных зон в местах расположения радиолокаторов типов МРЛ-5 и МРЛ-6	2552—82
147	Методические указания по определению и нормализации электромагнитной обстановки в местах размещения метеорологических радиолокаторов	3913—85
148	Методические указания по нормализации электромагнитной обстановки в местах размещения двухканальных метеорологических РЛС	4562—88
149	Методические указания по осуществлению госсаннадзора за объектами с источниками электромагнитных полей неионизирующей части спектра	2055—79
150	Методические указания «Определение уровней электромагнитного поля, границ санитарно-защитной зоны и зон ограничения застройки в места размещения передающих средств радиовещания и радиосвязи кило-, гекто-, и декаметрового диапазона»	МУК 4.3.044—96
151	Методические указания «Определение уровней электромагнитного поля, создаваемого излучающими техническими средствами телевидения, ЧМ радиовещания и базовых станций сухопутной подвижной радиосвязи»	МУК 4.3.1677—03 (в части базовых станций)
2.1.9. Товары бытового назначения, полимерные материалы и изделия		
152	Санитарные правила и нормы «Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции»	СанПиН 1.2.681—97

Продолжение

1	2	3
153	Санитарные правила и нормативы «Санитарные нормы допустимых уровней физических факторов при применении товаров народного потребления в бытовых условиях». Межгосударственные санитарные нормы и правила (государств-участников СНГ)	МСанПиН 001—96
154	Санитарные правила и нормы «Гигиенические требования к производству, качеству и безопасности средств гигиены полости рта»	СанПиН 1.2.676—97
155	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к изданиям книжным для взрослых»	СанПиН 1.2.1253—03
156	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к газетам для взрослых»	СанПиН 1.2.976—00
157	Санитарные правила и нормативы «Гигиенические требования к журналам для взрослых»	СанПиН 1.1.998—00
158	Полимерные и полимерсодержащие материалы и конструкции, разрешенные к применению в строительстве	Письмо зам. Гл. госсанврача РФ от 18.07.00 № 1100/24032—110
159	Перечень синтетических материалов, разрешенных для использования в производстве мебели	№ 142-12-295—91
160	Временные методические указания по гигиенической оценке искусственных кож и пленочных материалов	2035—79
161	Методические указания «Санитарно-гигиеническая оценка полимерных и полимерсодержащих строительных материалов и конструкций, предназначенных для применения в строительстве жилых, общественных и промышленных зданий»	МУ 2.1.2.1829—04
162	Санитарные правила и нормативы «Текстильные изделия. Качественные и количественные анализы волокон»	42-125-390а—85
163	Методические указания по санитарно-гигиенической оценке резиновых и латексных изделий медицинского назначения	МУ 4077—86
164	Методические указания «Санитарно-гигиеническая оценка стройматериалов с добавлением промотходов»	МУ 2.1.674—97
165	Санитарные правила и нормы «Полимерные и полимерсодержащие строительные материалы, изделия и конструкции. Гигиенические требования безопасности»	СанПиН 2.12.729—99
166	Методические указания «Санитарно-химическая оценка полимерных материалов, предназначенных для применения в видеодисплейных терминалах, персональных электронно-вычислительных машинах и элементах систем на их основе»	МУК 4.1.994—00

Руководитель Департамента госсанэпиднадзора,
заместитель Главного государственного санитарного врача
Российской Федерации С. И. Иванов

Перечень
основных действующих нормативных
и методических документов
по гигиене питания



Министерство здравоохранения Российской Федерации

127994, ГСП-4, Москва,
Рахмановский пер., 3,
телеграф: 485042,
телетайп № 485042,
факс: 504-44-46,
e-mail: gost.e-ecolog.ru
21.01.04, № 2510/493-04-32

Главным врачам Центров госсанэпиднадзора в субъектах Российской Федерации, регионов, на транспорте (водном и воздушном)

На № _____

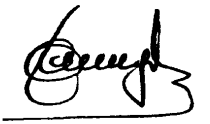
О действующих нормативных и методических документах по гигиене питания

Направляю для сведения и использования в работе «Перечень основных действующих нормативных и методических документов по гигиене питания» по состоянию на 1 июля 2003 года.

В соответствии с законодательством Российской Федерации на территории Российской Федерации действуют санитарные правила, нормы и гигиенический нормативы, утвержденные бывшим Министерством здравоохранения СССР, в части, не противоречащей санитарному законодательству Российской Федерации, бывшим Госкомсанэпиднадзором России, а также действуют документы, утвержденные Минздравом России.

Указанные документы действуют впредь до отмены либо принятия новых нормативных правовых актов взамен существующих.

Первый заместитель Министра здравоохранения, Главный государственный санитарный врач Российской Федерации



Г. Г. Онищенко

Подготовлен Департаментом госсанэпиднадзора Минздрава России (А. И. Петухов, И. В. Тихоненко), Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (А. А. Иванов, Е. Б. Терехова, В. В. Мясникова).

Содержание

Раздел 2. Гигиена 20

Группа 2.3. Гигиена питания 20

2.3.1. Рациональное питание 20

2.3.2. Продовольственное сырье, пищевые продукты и пищевые добавки 21

2.3.3. Тара, посуда, упаковка, оборудование и другие виды продукции, контактирующие с пищевыми продуктами 22

2.3.4. Предприятия пищевой и перерабатывающей промышленности (гигиенические вопросы в технологических процессах, сырье) 22

2.3.5. Предприятия торговли 24

2.3.6. Предприятия общественного питания 24

2.3.7. Состояние здоровья населения в связи с состоянием питания 24

Гигиена питания на транспорте 25

Раздел 4. Методы контроля 26

Группа 4.1. Химические факторы 26

Группа 4.4. Общие вопросы по методам контроля 27

Группа 1.2. Гигиена, токсикология, санитария 28

№ п/п	Наименование документа	Регистрационный номер
1	2	3
Раздел 2. Гигиена		
Группа 2.3. Гигиена питания		
2.3.1. Рациональное питание		
1	Нормы физиологических потребностей в пищевых веществах и энергии для различных групп населения	МЗ СССР № 5786—91 от 28.05.91
2	Санитарно-гигиенические нормы «Рекомендуемые (регламентируемые) уровни содержания витаминов в витаминизированных пищевых продуктах»	МЗ СССР 42-123-4717—88 от 01.11.88
3	Приказ «О дальнейшем улучшении проводимой в СССР обязательной С-витаминизации питания в лечебно-профилактических и других учреждениях»	МЗ СССР № 695 от 24.08.72
4	Инструкция о работе санитарно-эпидемиологических станций по контролю за С-витаминизацией готовой пищи, витаминным качеством рационов питания, содержанием витаминов в витаминных продуктах массового потребления и выдачей витаминных препаратов на промышленных предприятиях	МЗ СССР № 997—72 от 22.11.72
5	Рекомендуемый состав, критерии и показатели качества заменителей женского молока	МЗ СССР 5.08.88
6	Методические рекомендации по пропаганде принципов рационального питания	МЗ СССР № 4081—86 от 20.03.86
7	Методические указания по гигиеническому контролю за питанием в организованных коллективах	МЗ СССР № 4237—86 от 29.11.86
8	Рекомендуемые рациональные размеры потребления продуктов питания больных сахарным диабетом, входящих в группу риска	МЗ СССР № 4432—87 от 23.10.87
9	Методические рекомендации по организации рационального питания работников анилинокрасочной промышленности	МЗ СССР № 4720—88 от 04.11.88
10	Методические рекомендации по организации питания курсантов училищ речного флота	МЗ СССР № 2636—82 от 13.12.82
11	Рекомендации по рациональному питанию рабочих основных профессий литейных цехов машиностроительной промышленности	МЗ СССР № 1977—79 от 20.04.79
12	Методические указания по контролю за рациональным питанием экипажей речных судов	МЗ СССР № 1952—78 от 22.12.78
13	Гигиенические требования к качественному составу рациона горняков современных высокомеханизированных угольных шахт с учетом его роли в профилактике пневмокониоза (методические указания)	МЗ СССР № 3087—84 от 27.08.84
14	Методические рекомендации по изучению белкового статуса и потребностей в белке здорового и больного человека	МЗ СССР № 3168—84 от 10.12.84
15	Методические рекомендации по оценке обеспеченности организма человека витамином Д	МЗ СССР № 3176—84 от 27.12.84

Продолжение

1	2	3
16	Методические рекомендации по организации рационального питания учащихся ПТУ и ТУ строительного профиля в различных климатических зонах страны	МЗ СССР № 3903—85 от 27.06.85
17	Методические указания «Оценка обеспеченности организма человека витамином А»	МЗ СССР № 4284—87 от 12.05.87
18	Методические рекомендации по организации питания людей пожилого и старческого возраста	МЗ СССР № 1225—75 от 19.02.75
19	Методические рекомендации по изучению азотистого баланса у человека	МЗ СССР № 1935—78 от 26.10.78
20	Методические указания «Организация питания в детских стационарах»	МЗ СССР от 19.07.84
21	Инструкция ВЦСПС, Министерства торговли СССР и Министерства здравоохранения СССР по организации диетического питания	№ 21-15 от 15.08.88
22	Методические рекомендации по вопросам изучения фактического питания и состояния здоровья населения в связи с характером питания	МЗ СССР № 2967—84от 08.02.84
23	Методические указания по формированию наборов продуктов питания для расчетов потребности бюджетов различных групп населения	МЗ СССР № 5787—91 от 31.05.91
24	Методические рекомендации «Организация питания детей в загородных пионерских лагерях»	МЗ СССР № 1979—78 от 14.06.79
25	Инструктивно-методическое письмо «О контроле за выполнением норм питания в детских садах»	МЗ СССР № 8с-17-331 от 12.05.78
26	Методические указания по организации питания студентов в профилакториях	МЗ СССР № 2059—79 от 05.10.79
27	Рекомендации по рациональному питанию бойцов студенческих отрядов	МЗ СССР № 2987—84 от 12.04.84
28	Инструкция по методике расчета сбалансированной среднедушевой потребности в пищевых веществах и энергии населения СССР	МЗ СССР № 3241—85 от 29.03.85
29	Перечень вредных производственных факторов, при воздействии которых в профилактических целях рекомендуется употребление молока или других равноценных пищевых продуктов	Утв. приказом Минздрава России от 28.03.03 № 126
	2.3.2. Продовольственное сырье, пищевые продукты и пищевые добавки	
30	Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Гигиенические требования по применению пищевых добавок»	СанПиН 2.3.2.1293—03 МЗ РФ от 18.06.03
31	Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности продуктов	СанПиН 2.3.2.1078—01 МЗ РФ от 14.11.01 № 36
32	Дополнение № 1 к СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов»	СанПиН 2.3.2.1153—02 МЗ РФ от 20.08.02
33	Дополнения и изменения № 2 к СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов»	СанПиН 2.3.2.1280—03 МЗ РФ от 9.04.03
34	Предельно допустимые уровни (ПДУ) содержания смолы и никотина в табачных изделиях	ГН 2.3.2.1377—03 МЗ РФ от 9.06.03

Продолжение

1	2	3
35	Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников	Минздрав России МУК 2.3.2.970—00
36	Методические указания «Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище»	Минздрав России МУК 2.3.2.721—98
37	Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Гигиенические требования к организации производства и оборота биологически активных добавок к пище (БАД)»	МЗ РФ от 17.04.03 №50 О введении СанПиН 2.3.2.1290—03
	2.3.3. Тара, посуда, упаковка, оборудование и другие виды продукции, контактирующие с пищевыми продуктами	
38	Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами	Минздрав России ГН 2.3.2.972—00
39	Предельно допустимое количество миграции альдегидов (в т. ч. формальдегида) из оболочки искусственной белковой подобно «Белкозин»	Минздрав России ГН 2.3.3.1019—01
	2.3.4. Предприятия пищевой и перерабатывающей промышленности (гигиенические вопросы в технологических процессах, сырье)	
40	Санитарные правила и нормы «Производство молока и молочных продуктов»	ГКСЭН 2.3.4-551—96
41	Санитарные нормы и правила «Производство хлеба, хлебобулочных и кондитерских изделий»	ГКСЭН 2.3.4.545—96
42	Санитарные правила для предприятий макаронной промышленности	МЗ СССР № 989—72 от 29.08.72
43	Санитарные правила для предприятий по производству пищевых кислот	МЗ СССР № 45—74 от 11.01.74
44	Санитарные правила для предприятий по обработке и розливу питьевых минеральных вод	МЗ СССР № 4416—87 от 30.07.87
45	Санитарные правила для предприятий по производству растительных масел	МЗ СССР № 1197—74 от 18.11.74
46	Санитарные правила для предприятий крахмалопаточной промышленности	МЗ СССР № 1361—75 от 30.10.75
47	Санитарные правила и нормы «Производство спирта этилового ректификованного и ликероводочных изделий»	2.3.4.704—98 Департамент ГСЭН МЗ РФ
48	Санитарные правила для предприятий пищеконцентратной промышленности	МЗ СССР № 1408 от 01.03.76
49	Санитарные правила для предприятий желатиновой промышленности	МЗ СССР № 26.10.78
50	Санитарные правила для предприятий дрожжевой промышленности	МЗ СССР № 2266—80 от 26.11.80
51	Санитарные правила для предприятий соляной промышленности	МЗ СССР № 2449—81 от 30.09.81
52	Санитарные правила для предприятий пивоваренной и безалкогольной промышленности	МЗ СССР № 3244—85 от 09.04.85

Продолжение

1	2	3
53	Санитарные правила по заготовке, переработке и продаже грибов	ГКСЭН 2.3.4.009—93
54	Санитарные правила для предприятий маргариновой промышленности	МЗ СССР № 946-А—71 от 30.12.71
55	Санитарные правила для предприятий, вырабатывающих плодоовощные консервы, сушеные фрукты, овощи и картофель, квашеную капусту и соленые овощи	МЗ СССР № 962—72 от 04.04.72
56	Санитарные правила для предприятий чайной промышленности	МЗ СССР № 977—72 от 31.05.72
57	Санитарные правила для винодельческих предприятий	МЗ СССР № 5788—91 от 07.06.91
58	Санитарные правила и нормы «Производство и реализация рыбной продукции»	ГКСЭН 2.3.4-050—96
59	Инструкция по санитарной обработке специализированного подвижного состава и контейнеров, занятых на перевозке пищевых продуктов	МЗ РСФСР от 03.05.78 Минавтотранс РСФСР 15.05.78
60	Санитарные и ветеринарные правила для молочных ферм колхозов, совхозов и подсобных хозяйств	МЗ СССР от 29.09.86
61	Санитарные правила по уходу за доильными аппаратами, установками и молочной посудой, контролю их санитарного состояния и санитарного качества молока	МЗ СССР от 29.09.86
62	Санитарные правила для предприятий мясной промышленности	МЗ СССР № 3238—85 от 27.03.85
63	Санитарные и ветеринарные требования к проектированию предприятий мясной промышленности	ГСЭУ МЗ СССР от 01.07.77
64	Наставление по аэрозольной дезинфекции яичной и мясной тары на птицефабриках, в птицеводческих хозяйствах и на тароремонтных заводах	ГСЭУ МЗ СССР от 26.12.75
65	Методы обработки яичного меланжа с целью улучшения микробиологических показателей качества	ГСЭУ МЗ СССР от 24.11.77
66	Методические указания по осуществлению государственного надзора за мясоперерабатывающими предприятиями	МЗ СССР № 4086—86 от 28.03.86
67	Методические рекомендации «Организация комплексного контроля за санитарно-гигиеническим и противоэпидемическим режимом предприятий промышленного птицеводства»	МЗ РСФСР от 24.11.87
68	Инструкция по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности (извлечение)	МЗ СССР от 28.12.87
69	Методические указания по организации санитарно-эпидемиологической службой контроля за предприятиями молочной промышленности	МЗ СССР № 2642—82 от 27.12.82
70	Санитарные правила для предприятий, цехов и участков, вырабатывающих детские молочные продукты	ГСЭУ МЗ СССР № 2374—81 от 30.03.91
71	Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных	МЗ СССР № 5319—91 от 22.02.91

Продолжение

1	2	3
72	Гигиенические нормативы «Предельно допустимая концентрация содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) в продовольственном зерне пшеницы»	ГКСЭН 2.3.4.034—95
73	Методические рекомендации «Требования к горно-санитарной охране месторождений минеральных вод и лечебных грязей»	МЗ РФ № 96/1996
74	Инструкция по жарке изделий во фритюре в предприятиях общественного питания и контроль за качеством фритюрных жиров	МЗ СССР № 143-5/129-19
75	Инструкция по предупреждению картофельной болезни хлеба	Департамент ГСЭН МЗ РФ 1100/2451-98-115 от 14.10.98
76	Инструкция по санитарной обработке технологического оборудования и производственных помещений на предприятиях мясной промышленности	Департамент ГСЭН МЗ РФ 115-16/522-04 от 15.11.02
77	Методическое руководство по санитарно-микробиологическому контролю мясных молочных продуктов на наличие листерий	Департамент ГСЭН МЗ РФ 115-16/244-04 от 12.05.03
78	Инструкция по порядку и периодичности контроля за содержанием микробиологических и химических загрязнителей в мясе, птице, яйцах и продуктах их переработки	Департамент ГСЭН МЗ РФ 1400/1751 от 22.06.00
79	Дополнение к «Временной инструкции по применению дихлоризоцианурита натрия (мононатриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) для профилактической дезинфекции на предприятиях мясной промышленности»	МЗ СССР от 19.06.76
	2.3.5. Предприятия торговли	
80	Санитарно-эпидемиологические требования к организациям торговли и обороту в них продовольственного сырья и пищевых продуктов	Минздрав России СП 2.3.6.1066—01
81	Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Гигиенические требования к срокам годности и условиям хранения пищевых продуктов»	МЗ РФ СанПиН 2.3.2.1324—03 от 21.05.03
82	Санитарные правила для холодильников	МЗ СССР № 4695-88 от 29.09.88
	2.3.6. Предприятия общественного питания	
83	Санитарно-эпидемиологические требования к организациям общественного питания, изготовлению и оборотоспособности в них пищевых продуктов и продовольственного сырья	Минздрав России СП 2.3.6.1079—01
84	Санитарные правила для детских молочных кухонь	МЗ СССР № 942—71
85	Санитарные правила для предприятий по производству быстрозамороженных готовых блюд	МЗ СССР № 2982—84
86	Санитарные требования к индивидуальному питанию шахтеров в подземных выработках угольных шахт	МЗ СССР от 27.08.71
	2.3.7. Состояние здоровья населения в связи с состоянием питания	
87	Инструкция о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях	МЗ СССР № 1135—73 от 20.12.73

Продолжение

1	2	3
88	Методические указания по медико-биологической оценке и ранней диагностике интоксикаций регуляторами роста растений – производными пирозидина (гидразина)	МЗ СССР № 2436—88 от 02.07.88
89	Методические указания «Расследование, диагностика и лечение пищевых отравлений нитратами и нитритами»	МЗ СССР № 4220—86 от 11.11.86
90	Методические указания «Ботулизм»	МЗ СССР № 824—69 от 22.10.69
91	Указания по обнаружению и количественному учету шигелл Зонне в пищевых продуктах (дополнение к «Инструкции о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санэпидслужбы при пищевых отравлениях»)	МЗ СССР от 15.03.78
92	Методические рекомендации «Клиника, диагностика и лечение ботулизма»	МЗ СССР № 10/11—38 от 15.04.83
93	Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями	МЗ СССР № 04-23/3 от 17.12.84
94	Методические рекомендации по вопросам изучения фактического питания и состояния здоровья населения в связи с характером питания	МЗ СССР № 2967—84
95	Классификация пищевых отравлений	МЗ СССР № 2436—81
96	Контроль программы профилактики йодированных заболеваний путем всеобщего йодирования соли	Минздрав России МУ 2.3.7.1064—01
	Гигиена питания на транспорте	
97	Методические рекомендации «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемиологических (профилактических) мероприятий при производстве и реализации питания для пассажиров и членов экипажа воздушного судна»	Утв. заместителем Главного государственного врача РФ 19.03.03
98	Санитарные правила «Гигиенические требования к организации бортового питания авиапассажиров и членов экипажа воздушных судов гражданской авиации»	СП 2.5.1788—99
99	Санитарные правила для морских судов СССР. Раздел 2.11. Помещения пищевого блока и продовольственные кладовые. Раздел 5.6. Содержание помещений пищеблока; хранение и обработка пищевых продуктов	Утв. Минздравом СССР с изменениями и дополнениями 25.12.82 № 2641—82 13.11.84 № 122-6/452-1
100	Санитарные правила для морских судов промыслового флота СССР. Раздел 26. Помещения пищеблока и продовольственные кладовые. Раздел 6.6. Требования к приему и хранению пищевых продуктов, кулинарной обработке и реализации готовой продукции	Минздрав СССР 22.12.97 № 1814—77
101	Суда внутреннего и смешенного (река-море) плавания. Раздел 2.1.4. Помещения пищеблока для экипажа. Раздел 3.2. Организация питания экипажа и пассажиров	Минздрав России СанПиН 2.5.2.703—98
102	Санитарные правила для морских и речных портов СССР. Раздел «Пункты питания»	Минздрав СССР 02.06.89 № 4962—89

Продолжение

1	2	3
103	Санитарные правила для плавучих буровых установок. Разделы: 2.7. Помещения пищевого блока и продовольственных кладовых; 5.3. Санитарные требования по содержанию помещений и оборудования пищевого блока	Минздрав СССР 23.12.85 № 4056—85
104	Методические указания по вопросам изучения фактического питания плавсостава на судах и разработке мероприятий по его рационализации	Минздрав СССР 20.10.74 № 1199—74
105	Методические рекомендации по организации питания курсантов училищ речного флота	Минздрав СССР 13.12.82 № 2636—82
106	Методические указания по санитарно-микробиологическому контролю икорного производства	Минздрав СССР 13.05.85
	Раздел 4. Методы контроля **Группа 4.1. Химические факторы**	
107	Методические указания «Методика выполнения измерений массовой концентрации свободных альдегидов (в том числе формальдегиды) в белковой оболочке фотолитрическим методом»	Минздрав России МУК 4.1.1020—01
108	Методические указания «Изолирспецифическое определение полихлорированных бифенилов (ПХБ) в пищевых продуктах»	Минздрав России МУК 4.1.1023—01
109	Методика выполнения измерений массовой доли меди и цинка в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии	Минздрав России МУК 4.1.991—00
110	Методические указания «Определение массовой доли йода в пищевых продуктах и сырье титриметрическим методом»	Минздрав России МУК 4.1.1106—02
111	Методические указания «Методика выполнения измерений массовой доли свинца и кадмия в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии»	Минздрав России МУК 4.1.986—00
112	Методические указания «Определение содержания токсичных элементов в пищевых продуктах и продовольственном сырье. Методика автоклавной пробоподготовки»	Минздрав России МУК 4.1.985—00
113	Сборник методических указаний «Определение массовой концентрации аверсектина С в продуктах питания растительного происхождения (овощи, фрукты, ягоды) и в органах и тканях животных, плазме и молоке методом флуоресцентной высокоэффективной жидкой хроматографии»	Минздрав России МУК 4.1.1011—01; 4.1.1012—01
114	Методические указания «Вольтамперометрическое определение йода в пищевых продуктах»	Минздрав России МУК 4.1.1187—03
115	Определение массовой концентрации йода в пищевых продуктах	Минздрав России МУК 4.1.1481—03
116	Методика выполнения измерений доли кадмия, свинца, мышьяка, железа и меди в алкогольной продукции	Минздрав России МУК 4.1.1484—03
117	Определение содержания денатурирующих добавок (ингредиентов) в этиловом спирте и спиртсодержащей продукции из всех видов сырья	Минздрав России Сборник МУК 4.1.1486—4.1.1499—0

Продолжение

1	2	3
118	Измерение массовой концентрации химических веществ методом инверсионной вольтамперометрии (в пищевых продуктах, алкогольных напитках, воде, парфюмерно-косметической продукции)	Минздрав России Сборник МУК 4.1.150—4.1.1516—03
119	Руководство по методам контроля качества и безопасности БАД к пище	Р 4.1.1672—03
Группа 4.4. Общие вопросы по методам контроля		
120	Методические указания «Гигиеническая оценка сроков годности пищевых продуктов»	Минздрав России МУ 4.2.727—99
121	Методические указания «Методы микробиологического контроля готовых изделий с кремом»	Минздрав России МУК 4.2.762—99
122	Методические указания «Определение количества бифидобактерий в кисло-молочных продуктах»	Минздрав России МУК 4.2.1122—02
123	Санитарные правила «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемиологических (профилактических) мероприятий»	СанПиН 1.1.1058—01
124	Методические указания по отбору проб мяса, мясопродуктов, рыбы, рыбопродуктов, кормов и других жиросодержащих продуктов для определения полихлорированных дибензол-п-диоксинов и дибензофуранов методом хромато-масс-спектрометрии	Утверждено Минздравом России 15.06.99
125	«Перечень материалов, изделий и оборудования, допущенных для контакта с пищевыми продуктами», разрешенных Минздравом СССР за период с 1975 по 1986 гг.	Руководящий технический материал РТМ 27-72-15—82, ч. 1, изданные в 2002 г.
126	Методические материалы и учебные пособия для гигиенического обучения работников продовольственной торговли	1998 г. выпуска
127	Учебное пособие для гигиенического обучения работников общественного питания	1999 г. выпуска
128	Программа и учебное пособие для гигиенического обучения работников предприятий молочной промышленности	1999 г. выпуска
129	Программа и учебное пособие для гигиенического обучения работников предприятий по производству хлеба, хлебобулочных и кондитерских изделий	2000 г.
130	Применение ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздушной среды помещений организаций пищевой промышленности, общественного питания и торговли продовольственными товарами	МУ 2.3.975—00
131	Требования к проведению государственного санитарно-эпидемиологического надзора за предприятиями, вырабатывающими хлеб, хлебобулочные и кондитерские изделия	Сборник, 2002 г.
132	Методические указания по методам контроля «Радиационный контроль. Стронций-90 и цезий-137. Пищевые продукты. Отбор проб, анализ и гигиеническая оценка»	Минздрав России МУК 2.6.1.717—98

Продолжение

1	2	3
Группа 1.2. Гигиена, токсикология, санитария		
133	Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды	ГН 1.1.546—96 ГК СЭН
134	Дополнение № 1 к ГН 1.1.546—96	ГН 1.1.1109—02
135	Дополнение № 2 к ГН 1.1.546—96	ГН 1.1.1171—02
136	Дополнение № 3 к ГН 1.1.546—96 и изменение к ГН 1.1.1171—02 (дополнение № 2 к ГН 1.1.546—96)	ГН 1.1.1196—03
137	Дополнение № 4 к ГН 1.1.546—96	ГН 1.1.1197—03
138	Инструкция по санитарно-химическому исследованию изделий, изготовленных из полимерных материалов, предназначенных для контакта с пищевыми продуктами	№ 880—71, 02.02.71
139	Методические указания к гигиенической оценке печатных красок, предназначенных для полиграфического оформления упаковочных материалов, применяемых в пищевой промышленности	МУ № 1833—78, 03.04.78
140	Инструкция по токсикологической оценке полимерных материалов, применяемых в пищевой промышленности	№ 2395—81, 12.03.81
141	Методические указания по гигиенической оценке кремнийорганических и фторорганических покрытий, предназначенных для использования в пищевой промышленности при температуре выше 100 °С	МУ 3043—84, 14.06.84
142	Методические указания по осуществлению государственного санитарного надзора за производством и применением полимерных материалов класса полиолефинов, предназначенных для контакта с пищевыми продуктами	МУ № 4149—86, 29.09.86
143	Методические указания по санитарно-химическим исследованиям резин и изделий из них, предназначенных для контакта с пищевыми продуктами	МУ № 4077—86, 10.03.86
144	Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами	ГН 2.3.3.972—00

Руководитель Департамента госсанэпиднадзора,
заместитель Главного государственного санитарного врача
Российской Федерации С. И. Иванов

2.1.6. АТМОСФЕРНЫЙ ВОЗДУХ И ВОЗДУХ ЗАКРЫТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ, САНИТАРНАЯ ОХРАНА ВОЗДУХА

Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест

Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.1338—03

Гигиенические нормативы
ГН 2.1.6.1765—03

1. Перечень подготовлен секцией «Гигиена атмосферного воздуха» (Л. А. Тепикина, М. А. Пинигин) Проблемной комиссии «Научные основы экологии человека и гигиены окружающей среды» РАМН.

2. Рекомендован к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Минздраве России (протокол № 19 от 19.09.03).

3. Гигиенические нормативы утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 13 октября 2003 г. и введены в действие с 1 декабря 2003 г.

4. Введены в качестве дополнения № 1 к ГН 2.1.6.1338—03.

5. Зарегистрированы в Минюсте России (регистрационный номер 5187 от 21.10.03).

Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52-ФЗ от 30 марта 1999 г.

«Государственные санитарно-эпидемиологические правила и нормативы (далее – санитарные правила) – нормативные правовые акты, устанавливающие санитарно-эпидемиологические требования (в том числе критерии безопасности и (или) безвредности факторов среды обитания для человека, гигиенические и иные нормативы), несоблюдение которых создает угрозу жизни или здоровью человека, а также угрозу возникновения и распространения заболеваний» (статья 1).

«Соблюдение санитарных правил является обязательным для граждан, индивидуальных предпринимателей и юридических лиц» (статья 39).

«За нарушение санитарного законодательства устанавливается дисциплинарная, административная и уголовная ответственность» (статья 55).

Министерство здравоохранения Российской Федерации

ГЛАВНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ САНИТАРНЫЙ ВРАЧ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

П О С Т А Н О В Л Е Н И Е

17.10.03 Москва № 150

О введении в действие
ГН 2.1.6.1765—03

На основании Федерального закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ и Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554

ПОСТАНОВЛЯЮ:

Ввести в действие с 1 декабря 2003 г. гигиенические нормативы «Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.1338—03», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 30 марта 2003 г. – ГН 2.1.6.1765—03.

Г. Г. Онищенко

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра
здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
13 октября 2003 г.
Дата введения: 1 декабря 2003 г.

2.1.6. АТМОСФЕРНЫЙ ВОЗДУХ И ВОЗДУХ ЗАКРЫТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ, САНИТАРНАЯ ОХРАНА ВОЗДУХА

Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест

Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.1338—03)

Гигиенические нормативы
ГН 2.1.6.1765—03

№ п/п	Наименование веществ	№ CAS	Формула	Величина ПДК (мг/м^3)		Лимитирующий показатель вредности	Класс опасности
				максимальная разовая	среднесуточная		
1	2	3	4	5	6	7	8
1	[1S-[1-α, 3- α, 7- α 8- β (2S*, 4S*), 8 α- β]]-1,2,3,7,8,8а-Гексагидро-3,7-диметил-8-[2-(тетрагидро-4-гидрокси-6-оксо-2Н-пиран-2-ил)этил]-1-нафталенил-2,2-диметилбутаноат (симвастин, веросимвастин, зокор, симвор, симгал, симвинолин, вазилип)	79902-63-9	$C_{25}H_{38}O_5$	0,0005	0,0002	Рез.	1
2	2,3,3,4,4,5-гексаметилгексантиол-2 (трет-додецилмеркаптан; трет-додекантиол; лаурилмеркаптан; трет-додецилтиол)	25103-58-6	$C_{12}H_{26}S$	0,005	–	Рефл.	4
3	Гексафторэтан (фреон 116)	76-16-4	C_2F_6	100,0	20,0	Рефл.-резорбт.	4

Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8
4	Декафторбутан (перфторбутан; фреон 31-10)	335-25-9	C_4F_{10}	100,0	20,0	Рефл.-рез.	4
5	диКалий водородфосфат тригидрат (калий фосфорнокислый двузамещенный 3-х водный /в пересчете на калий/	7778-80-5	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,15	0,05	Рез.	4
6	Октафторпропан (фреон 218)	76-19-7	C_3H_8	100,0	20,0	Рефл.-рез.	4
7	Тетрафторметан (фреон 14)	75-73-0	CF_4	100,0	20,0	Рефл.-рез.	4

Приложение 1
(справочное)

**Указатель основных синонимов,
технических, торговых и фирменных названий веществ**

Вещество	Порядковый номер
Вазилип	1
Веро-симвастин	1
трет-Додекантиол	2
трет-Додецилмеркаптан	2
трет-Додецилтиол	2
Зокор	1
Калий фосфорно-кислый двузамещенный 3-водный	5
Лаурилмеркаптан	2
Перфторбутан	4
Симвастин	1
Симвинолин	1
Симвор	1
Симгал	1
Фреон 116	3
Фреон 14	7
Фреон 218	6
Фреон 31-10	4

Приложение 2
(справочное)

Учреждения-разработчики ПДК

Учреждение	Порядковый номер вещества
НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина РАМН	1, 5
Санкт-Петербургский НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФУ МБ и ЭП МЗ РФ	3, 4, 6, 7
Российский государственный медицинский университет МЗ РФ	2
Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ МЗ РФ	2

2.1.6. АТМОСФЕРНЫЙ ВОЗДУХ И ВОЗДУХ ЗАКРЫТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ, САНИТАРНАЯ ОХРАНА ВОЗДУХА

Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест

Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.1339—03

Гигиенические нормативы
ГН 2.1.6.1764—03

1. Разработаны: Л. А. Тепикина, М. А. Пинигин (секция «Гигиена атмосферного воздуха» Проблемной комиссии «Научные основы экологии человека и гигиены окружающей среды» РАМН).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Минздраве России (протокол № 19 от 19.09.03).

3. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 13 октября 2003 г.

4. Введены в действие с 1 декабря 2003 г.

5. Введены в качестве дополнения № 1 к ГН 2.1.6.1339—03.

6. Зарегистрированы в Министерстве юстиции Российской Федерации 21 октября 2003 г. Регистрационный номер 5186.

Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52-ФЗ от 30 марта 1999 г.

«Государственные санитарно-эпидемиологические правила и нормативы (далее – санитарные правила) – нормативные правовые акты, устанавливающие санитарно-эпидемиологические требования (в том числе критерии безопасности и (или) безвредности факторов среды обитания для человека, гигиенические и иные нормативы), несоблюдение которых создает угрозу жизни или здоровью человека, а также угрозу возникновения и распространения заболеваний» (статья 1).

«Соблюдение санитарных правил является обязательным для граждан, индивидуальных предпринимателей и юридических лиц» (статья 39).

«За нарушение санитарного законодательства устанавливается дисциплинарная, административная и уголовная ответственность» (статья 55).

Министерство здравоохранения Российской Федерации

ГЛАВНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ САНИТАРНЫЙ ВРАЧ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

П О С Т А Н О В Л Е Н И Е

17.10.03 Москва № 151

О введении в действие
ГН 2.1.6.1764—03

На основании Федерального закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ и Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554

ПОСТАНОВЛЯЮ:

Ввести в действие с 1 декабря 2003 г. гигиенические нормативы «Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.1339—03. ГН 2.1.6.1764—03», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 13 октября 2003 г.

Г. Г. Онищенко

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
13 октября 2003 г.
Дата введения: 1 декабря 2003 г.

2.1.6. АТМОСФЕРНЫЙ ВОЗДУХ И ВОЗДУХ ЗАКРЫТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ, САНИТАРНАЯ ОХРАНА ВОЗДУХА

Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест

Дополнение № 1 к ГН 2.1.6.1339—03

Гигиенические нормативы
ГН 2.1.6.1764—03

№ п/п	Наименование веществ	№ CAS	Формула	ОБУВ, мг/м^3
1	2	3	4	5
1	3-(2-Аминоэтил)-1Н-индол-5-ол гександиоат (5-окситриптамин адипинат; серотонин адипинат)	16031-83-7	$C_{10}H_{12}N_2O$ $C_6H_{10}O_4$	0,0005
2	3-(2-Аминоэтил)-5-(фенилметокси)-1Н-индол-2-карбоновая кислота (5-бензилокситриптамин-2-карбоновая кислота)	54987-14-3	$C_{18}H_{18}N_2O_3$	0,01
3	Аммоний перренат	13598-65-7	H_4NO_4Re	0,02
4	1-Бензил-1-фенилгидразин гидрохлорид	5705-15-7	$C_{13}H_{14}N_2 \cdot HCl$	0,01
5	Бис-(1-метилэтил)нафталинсульфоновая кислота натриевая соль (супражил WP)	1322-93-6	$C_{16}H_{20}O_3SNa$	0,01
6	бета –Галактозидаза			0,03
7	1,1,1,2,3,3,3-Гептафторпропан (хладон 227еа)	431-89-0	C_3HF_7	20,0
8	4,5-Дигидро-2-(1-нафталинилметил)-1Н-имидазол гидрохлорид (нафтизин гидрохлорид)	550-99-2	$C_{14}H_{14}N_2 \cdot HCl$	0,0005

Продолжение

1	2	3	4	5
9	4,5-Дигидро-2-(1-нафталинилметил)-1Н-имидазол нитрат (нафтизин нитрат)	5144-52-5	$C_{14}H_{14}N_2$	0,0005
10	N,N –Диэтил-5,5'-дифенил-2-пентин-1-амин гидрохлорид (педифен)	3146-15-4	$C_{21}H_{25}N \cdot HCl$	0,002
11	Калий пероксигидрофторид		$KF \cdot H_2O_2$	0,02
12	1-Метил-5-[2'-(диметил-бензиламмо-нио)этил]карбамоилпиперидиний-2-альдоксим дихлорид (карбоксим)		$C_{19}H_{26}Cl_2N_4O_2$	0,01
13	Метилен-бис-(полиметилнафтилсульфонат) натрия (супражил MNS/90)	81065-51-2	$C_{23}H_{22}Na_2O_6S_2$, при n=1	0,03
14	Монофенилуретан		$C_{15}N_{12}N_2O_3$	0,04
15	Натрий селенит			0,0001
16	4-Пиперидино-1-фенил-1-циклопентил-2-бутин-1-ол гидрохлорид (пентифин)	79902-63-9	$C_{20}H_{27}NO$ HCl	0,001
17	Полиэнзимный препарат Феркон (БК мацеробациллина – 10—20 %; БК целло-веридина- 60—70 %; наполнитель – 30—10 %) (по целловеридину)			0,02
18	Пыль катализаторная каталитического крекинга (состав в %: SiO_2 – 52,0; Al_2O_3 – 43,0; La_2O_3, CeO_3 – 1,85; TiO_2 – 1,6; Fe_2O_3 – 0,56; Na_2O – 0,35; K_2O – 0,13; MgO – 0,1; P_2O_5 – 0,07; CaO – 0,07)			0,04
19	Пыль мучная риса и кукурузы			0,5
20	Пыль овощная сушеная (капуста, морковь)			0,1
21	Тетрабутилфосфоний бромид	3115-68-2	$[(C_4H_9)_4P]Br$	0,01
22	2,3,4,9-Тетрагидро-6-(фенилметокси) –1Н-пиридо[3,4,-b]индол-1-он (карболин)	51086-22-7	$C_{18}H_{16}N_2O_2$	0,01
23	3,4,5,6-Тетрагидрофталимидометил-(IRS)-цис,транс-хризантемат (d-тетраметрин; неопинамин-форте)	7696-12-0	$C_{19}H_{25}NO_4$	0,3

Продолжение

1	2	3	4	5
24	5-(Фенилметокси)-1Н-индол-3-этанамин (5-бензилокситриптамин)	20776-45-8	$C_{17}H_{18}N_2O$	0,005
25	5-(Фенилметокси)-1Н-индол-3-этанамин моногидрохлорид (5-бензилокситриптамин хлоргидрата)	52055-23-9	$C_{17}H_{18}N_2O$ HCl	0,005
26	2-[2-[5-(Фенилметокси)-1Н-индол-3-ил]этил]-1Н-изоиндол-1,3(2Н)-дион (N-фталил-5-бензилокситриптамин)	53157-45-2	$C_{25}H_{20}N_2O_3$	0,01
27	3-[[4-(Фенилметокси)-фенил]гидразон] пиперидин-2,3-дион (гидразон)	101783-07-7	$C_{18}H_{19}N_3O_2$	0,02
28	о-Фталевый альдегид		$C_6H_4(CHO)_2$	0,01
29	Цитилпиридиний хлорид моногидрат		$C_{21}H_{38}ClN$ H_2O	0,005
Утвердить сроком на один год				
30	Пыль кофе			0,06
Вещества, выброс которых в атмосферный воздух запрещен				
31	эндо–α-Гидрокси-α,α-дифенилуксусная кислота 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]окт-3-ил эфир гидрохлорид (глипин)	1674-94-8	$C_{22}H_{25}NO_3$ HCl	

Приложение 1
(справочное)

**Указатель основных синонимов,
технических, торговых и фирменных названий веществ**

Вещество	Порядковый номер
5-Бензилокситриптамин	24
5-Бензилокситриптамин хлоргидрат	25
5-Бензилокситриптамин-2-карбоновая кислота	2
Гидразон	27
Глипин	31
Карбоксим	12
Карболин	22
Нафтизин гидрохлорид	8
Нафтизин нитрат	9
Неопинамин-форте	23
5-Окситриптамин адипинат	1
Педифен	10
Пентифин	16
d-Тетраметрин	23
Серотонин адипинат	1
Супражил MNS/90	13
Супражил WP	5
N-Фталил-5-бензилокситриптамин	26
Хладон 227еа	7

Приложение 2
(справочное)

Учреждения-разработчики ОБУВ

Учреждение	Порядковый номер вещества
Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ (ВНЦ БАВ)	1, 2, 8, 9, 10, 12, 16, 22, 24, 25, 26, 27, 31
ЗАО «НИЦБЫТХИМ»	23
НИИ дезинфектологии МЗ РФ	11, 28, 29
НИИ медицины труда РАМН	7, 21
НИЦ «ЭКОС»	4, 5, 6, 13
ОАО НИИ «Ярсинтез»	18
Российский государственный медицинский университет МЗ РФ	3, 15, 17, 19, 20, 30
Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова МЗ РФ	14
ФГУН Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья МЗ РФ	14
Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ МЗ РФ	3

2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов

Методические указания
МУ 2.3.2.1830—04

1. Разработаны ГУ Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН: А. Л. Гинцбург – руководитель, Н. А. Зигангирова, Б. С. Народицкий, Л. Н. Нестеренко, И. А. Шагинян, М. Ю. Чернуха, Ю. В. Ананьина; Министерством здравоохранения РФ, Департаментом госсанэпиднадзора МЗ РФ: Г. Г. Онищенко, А. И. Петухов; Институтом питания РАМН: В. А. Тутельян, С. А. Шевелева; Институтом вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН: Б. Ф. Семенов; Московским государственным университетом прикладной биотехнологии Министерства общего и профессионального образования Российской Федерации: И. А. Рогов, А. Ф. Валихов, В. И. Ганина.

2. Утверждены 9 января 2004 г., введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации с 1 февраля 2004 г.

3. Введены впервые.

Содержание

1. Общие положения и область применения 48

2. Нормативные ссылки 48

3. Порядок санитарно-эпидемиологической экспертизы и выдачи санитарно-эпидемиологического заключения пищевой продукции, полученной с использованием ГММ 49

4. Микробиологическая оценка ГММ, используемых для производства пищевой продукции 51

5. Молекулярно-генетическая оценка ГММ, используемых для производства пищевой продукции 72

Приложение. Термины и определения 88

Библиографические данные 89

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра
здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
9 января 2004 г.
Дата введения: 1 февраля 2004 г.

2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов

Методические указания
МУ 2.3.2.1830—04

1. Общие положения и область применения

1.1. Методические указания устанавливают требования к проведению микробиологической и молекулярно-генетической оценки пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов (далее – *ГММ*).

1.2. Методические указания предназначены для учреждений санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также для других учреждений, аккредитованных на проведение работ в этой области в установленном порядке.

1.3. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях в отношении пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, применяются на этапах постановки на производство, санитарно-эпидемиологической экспертизы, выдачи заключения по санитарно-эпидемиологической экспертизе, закупки, ввоза в страну и реализации.

1.4. Методические указания разработаны с целью обеспечения единого, научно обоснованного подхода к оценке качества и безопасности пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, на этапах разработки, экспертизы и выдачи санитарно-эпидемиологического заключения для этой продукции.

1.5. Производитель пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, предназначенной для реализации на территории Российской Федерации, при маркировке должен вносить информацию на этикетку об использовании ГММ в соответствии с установленным порядком.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52-ФЗ от 30.03.99.

2.2. Федеральный закон «О внесении изменений и дополнений в Закон Российской Федерации «О защите прав потребителей» № 2-ФЗ и Кодекс РСФСР об административных правонарушениях» от 9 января 1996 г. (ред. от 30.12.01).

2.3. Федеральный закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов» № 29-ФЗ от 02.01.00.

2.4. Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» № 86-ФЗ от 05.06.96 (ред. от 12.07.00).

2.5. Федеральный закон «О внесении изменений и дополнений в Федеральный закон о государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» № 96-ФЗ от 21.06.00.

2.6. «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22 июля 1993 г. № 5487-1 (ред. от 30.06.03).

2.7. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации № 554 от 24.07.00.

2.8. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников» № 7 от 6.04.99.

2.9. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов» № 149 от 16.09.03.

2.10. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078—01.

2.11. Приказ Минздрава РФ «О санитарно-эпидемиологической экспертизе продукции» № 325 от 15.08.01 (ред. от 18.03.02) (зарегистрированный в МЮ РФ 19.10.01 № 2978).

3. Порядок санитарно-эпидемиологической экспертизы и выдачи санитарно-эпидемиологического заключения пищевой продукции, полученной с использованием ГММ

3.1. Вся пищевая продукция, полученная с использованием жизнеспособных микроорганизмов, проходит санитарно-эпидемиологическую экспертизу в установленном порядке. Заявитель должен декларировать наличие генных модификаций у штаммов, используемых для производства продуктов питания.

3.2. Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы и выдачи заключения по санитарно-эпидемиологической экспертизе пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, осуществляется в соответствии с порядком, установленным:

- постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников» № 7 от 06.04.99;
- постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов» № 149 от 16.09.03;
- приказом Минздрава РФ «О санитарно-эпидемиологической экспертизе продукции» № 325 от 15.08.01 (ред. от 18.03.02) (зарегистрированным в МЮ РФ 19.10.01 № 2978).

3.3. Юридические лица и индивидуальные предприниматели представляют в центр санитарно-эпидемиологического нормирования, гигиенической сертификации и экспертизы Министерства здравоохранения Российской Федерации комплект документов и материалов, включающий:

• заявку (письмо) на проведение гигиенической оценки и санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевой продукции, *полученной с использованием* ГММ;

• материалы, отражающие медико-генетическую оценку пищевой продукции, полученной с использованием ГММ;

• материалы, отражающие технологические свойства пищевой продукции, полученной с использованием ГММ;

• материалы, отражающие медико-биологическую оценку пищевой продукции, полученной с использованием ГММ;

• материалы, отражающие молекулярно-биологические и микробиологические характеристики ГММ:

1) документацию, подтверждающую таксономическую принадлежность штамма, установленную по фенотипическим и генотипическим свойствам (паспорт штамма);

2) название штамма, соответствующее кодам Международной номенклатуры;

3) свидетельство о депонировании штамма;

4) документацию, содержащую сведения о фенотипических и генотипических характеристиках штамма, включая информацию о наличии плазмид;

5) документацию, подтверждающую происхождение и подлинность микроорганизма-реципиента, включая документацию о всех известных генетических модификациях его, индуцированных как генно-инженерными, так и традиционными методами;

6) источник и нуклеотидную последовательность целевого гена и его регуляторных элементов;

7) цель генной модификации;

8) происхождение и таксономическое положение штамма-донора, установленные методами молекулярной геносистематики;

9) характеристику средств доставки целевого гена в клетки реципиента (физическую карту вектора, наличие полилинкеров и селективных маркеров);

10) стабильность интеграции чужеродной ДНК в хромосому или плазмиду ГММ;

11) использование транспозонов при конструировании штаммов ГММ;

12) фенотипические, биологические, патогенные свойства ГММ, взаимодействие с резидентной флорой кишечника человека;

13) стабильность генотипических и фенотипических характеристик ГММ;

14) способность к передаче генетического материала от ГММ в резидентную флору кишечника человека и в клетки макроорганизма.

Кроме вышеперечисленного, заявитель должен предоставить сведения об официальном разрешении на применение в пищевой промышленности и/или в свободной продаже населению, и о разрешении на экспорт из страны продукта с данным ГММ (оригиналы или заверенные копии документов установленного образца).

3.4. Объем и программа проведения работ по оценке качества и безопасности пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, определяется экспертами ГУ НИИ питания РАМН и Центра по экспертизе ГУ НИИЭМ им. Гамалеи РАМН по результатам экспертизы представленных материалов, а также в зависимости от ее принадлежности к пищевым продуктам на основе:

• новых штаммов, не имеющих разрешения на применение в производстве пищевых продуктов;

• штаммов, проходивших ранее экспертизу в установленном порядке, и допущенных в качестве заквасочных, стартовых, пробиотических, дрожжевых культур и штаммов-продуцентов пищевых веществ и пищевых добавок и используемых в пищевой промышленности.

Кроме того, при этом учитывается группа продукции по признаку наличия ГММ в жизнеспособном состоянии на момент потребления:

1) пищевые продукты, содержащие ГММ в живом состоянии – кисломолочные, пробиотические продукты, напитки брожения и пиво непастеризованные, *закваски и стартовые культуры*, готовые мясные продукты, изготовленные с использованием стартовых культур;

2) пищевые продукты, изготовленные при помощи ГММ, и в которых в процессе технологии они были инактивированы (напитки брожения и пиво пастеризованные, термизированные кисломолочные продукты и др.);

3) пищевые продукты, изготовленные при помощи ГММ, и которые в дальнейшем освобождены от них в процессе производства (ферментные препараты, белки).

Для концентрации внимания экспертизы на продукции, представляющей наибольший риск, последняя группа подразделяется на «негативный» и «позитивный» листы, при этом в негативный лист включаются полученные при использовании ГММ продукты, не содержащие белка и ДНК (пищевые кислоты, витамины, жирные кислоты) и *ферменты для спиртовой промышленности.*

Работа по экспертизе продукции, включенной в негативный лист, должна предусматривать первоочередный анализ документальных материалов, и в случае необходимости – анализ при помощи лабораторных методов.

3.5. Для проведения работ по оценке качества и безопасности пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, фирма-изготовитель поставляет образцы продукции и используемые культуры штаммов ГММ, в количестве необходимом для проведения полного объема исследований.

3.6. На основании экспертизы представленных документов и материалов, и результатов проведенных молекулярно-генетических, микробиологических и технологических исследований продукции центр санитарно-эпидемиологического нормирования, гигиенический сертификации и экспертизы Минздрава России оформляет бланк санитарно-эпидемиологического заключения (или мотивированное заключение об отказе) и передает его на подпись в Департамент госсанэпиднадзора Минздрава России. Санитарно-эпидемиологическое заключение подписывается Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, а в его отсутствие – начальником Департамента госсанэпиднадзора, заместителем Главного государственного санитарного врача Российской Федерации.

4. Микробиологическая оценка ГММ, используемых для производства пищевой продукции

Необходимость проведения тех или иных исследований по данному разделу и для каждого конкретного вида пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, определяется экспертом центра по экспертизе ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН.

4.1. Сравнительный анализ фенотипических свойств ГММ, штамма-реципиента или референтного штамма

4.1.1. Сущность метода

Сравнительный анализ фенотипических свойств основан на идентификации основных фенотипических свойств исследуемого ГММ, штамма-реципиента или референтного штамма того же вида для определения стабильности фенотипических признаков.

Оптимальными методами исследования фенотипических свойств являются методы идентификации микроорганизмов с помощью диагностических панелей, выпускаемых отечественными и зарубежными производителями и разрешенными к использованию в установленном порядке. Данные системы одноразового пользования предназначены для определения биохимической активности и последующей идентификации в течение 18—24 часов. Дополнительными методами исследования фенотипических свойств являются чувствительность к антибиотикам, к бактериофагам (для некоторых видов ГММ).

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

4.1.2.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений РН ± 0,01	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Баня водяная с подогревом	ГОСТ 12026—76
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-2, МБИ-3, МБР-3	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские	ГОСТ 19569—89Е
или аналогичные	
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150	ТУ 16-535—84
или других видов	
Холодильник бытовой электрический	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Штативы для пробирок	
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145—84
Микроволновая печь	

4.1.2.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76

Бутыли стеклянные для химических реактивов	
Кастрюли эмалированные	ГОСТ 24778—81
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
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Ступка фарфоровая с пестиком	ГОСТ 9147—80
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С (цена деления шкалы 1 °С)	ГОСТ 13646—68
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Книга-каталог кодов для идентификации	
Бланки для регистрации результатов	
Микробиологические петли	
Фломастеры-маркеры	

4.1.2.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ)
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
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4328—77
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 31739—78
Набор реактивов для окраски по Граму	
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Экстракт дрожжевой*	
Триптон*	
Антибиотики разных групп*	
Диски с антибиотиками*	

* Реактивы производства разных фирм, прошедшие государственную регистрацию и разрешенные для использования в установленном порядке.

Питательные среды:

Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов	ТУ 9229-083-00419785—97
Питательный бульон	ТУ 10-02-02-789-176—94
Сухая питательная среда типа АГВ для определения чувствительности к антибиотикам	ТУ 9229-083-00419785—97
Питательная среда Мюллер-Хинтона разных фирм для определения чувствительности к антибиотикам	
Сухая питательная среда для определения чувствительности к антибиотикам диффузионным методом	ГОСТ Р 51600—00
Питательные среды для определения	ТУ 9229-072-00419785—97
энтеробактерий	ГОСТ 29184—91
Среды для определения дрожжей и	ТУ 9229-083-00419785—97
микроскопических грибов (агар Сабуро, сывороточный и др.)	ГОСТ 10444.12—88
Среды для определения S. aureus	ГОСТ 10444.1, п. 5.1, п. 5.4
(типа Байд-Паркера, солевой агар)	
Среды для выращивания бифидобактерий, молочнокислых и пропионово-кислых бактерий (ГМС, М17, MRS)	ТУ 10-02-02-789-192—95
Планшеты для идентификации культур, выпускаемых отечественными и зарубежными производителями и разрешенными к использованию в установленном порядке	
Реактивы для ряда тестов в зависимости от идентифицируемого вида ГММ	
Дезинфицирующий раствор	
Микробиологические петли, скальпель	
Стандарт мутности по McFarland	

Допускается использование других коммерческих питательных сред и диагностических тест-систем аналогичного назначения для проведения исследований фенотипических свойств в соответствии с данным документом. При их применении необходимо руководствоваться рекомендациями изготовителя.

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь сертификат качества ИСО 9000 или EN 29 000.

Питательные среды и препараты отечественного производства должны соответствовать нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

4.1.3. Методика проведения исследования

4.1.3.1. Выделение ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма

Чистую культуру ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма выделяют, пользуясь общепринятыми в микробиологии методами на рекомендованной для данного вида ГММ и штамма-реципиента питательной среде. Например, выделение чистой культуры ГММ вида термофильных стрептококков должно осуществляться со среды типа М17 по ГОСТ 51331—99, а лактобактерий – со среды MRS по ГОСТ 51339—99.

4.1.3.2. Постановка реакции биохимической идентификации ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма

Из чистой 18—24 часовой культуры готовят суспензию в стерильной дистиллированной воде. Суспензию тщательно гомогенизируют. Суспензию доводят до определенной мутности по шкале McFarland в зависимости от исследуемого вида ГММ и штамма-реципиента. Неправильно приготовленная суспензия (слишком густая или очень жидкая) может привести к получению ложных результатов.

Параллельно суспензию ГММ, штамма-реципиента или контрольного штамма высевают на питательные среды для проверки чистоты культуры, ее ростовых свойств и/или постановки дополнительных тестов.

Планшет для идентификации извлекают из полиэтиленовой упаковки и на прилагаемом к планшету бланке регистрируют номер ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма.

Суспензию бактерий тщательно встряхивают и в каждую лунку инокулируют определенный объем суспензии (0,1—0,2 $см^3$) в зависимости от фирмы-изготовителя и вида исследуемого ГММ и штамма-реципиента.

После инокуляции в ряд лунок может добавляться стерильное вазелиновое масло полностью закрывающее внесенную суспензию клеток для создания анаэробных условий.

После инокуляции планшет накрывают крышкой и инкубируют 5—24 часа при оптимальной температуре для исследуемого вида ГММ (например, 25—28 °С дрожжи, 42 °С – лактобациллы).

По окончании инкубации проверяют рост и чистоту культуры методом посевов на селективные жидкие или плотные питательные среды.

В некоторые лунки (например, ферментация индола) могут быть добавлены реактивы. Учет результатов на бета-галактозидазу проводят дважды: через 3—5 часов и через 18—24 часов. Результаты учитывают визуально с помощью таблицы «Интерпретация реакций» и заносят в бланки.

Идентификацию проводят с помощью таблиц и книг-каталогов кодов соответствующих фирм.

Стабильность фенотипических свойств ГММ и штамма-реципиента проверяют методом пассирования ГММ и штамма-реципиента на жидких и плотных питательных средах и дальнейшим через 3—5 пассажей трехкратным тестированием биохимических свойств ГММ и штамма-реципиента. Трехкратное совпадение всех исследованных биохимических реакций, выявленное при неоднократном пассировании культур (не менее 10 пассажей) будет свидетельствовать о стабильности фенотипических признаков ГММ и штамма-реципиента. Вариабельность результатов по 1—2 реакциям будет являться свидетельством необходимости постановки дополнительных тестов на стабильность

фено- и генотипических признаков у ГММ и штамма-реципиента. Вариабельность результатов по большему числу реакций будет служить свидетельством нестабильности фенотипических признаков у ГММ.

4.1.3.3. Определение чувствительности к антимикробным препаратам ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма

Чувствительность к антимикробным препаратам может быть в ряде случаев хорошим маркером фенотипических свойств ГММ и штамма-реципиента. В определенных случаях, а именно, тестирования пробиотиков, определение чувствительности к антимикробным препаратам является обязательным тестом в микробиологической и молекулярно-генетической оценке ГММ.

Основой для выбора антибактериальных препаратов, подлежащих включению в исследование, являются данные о природной устойчивости или чувствительности отдельных видов ГММ или их групп, о распространении среди них приобретенной резистентности, а также о клинической эффективности антибиотиков.

Современные стандартизованные методы оценки антибиотикорезистентности подразделяются на методы серийных разведений и диффузионные. В зависимости от вида ГММ и штамма-реципиента, предназначения ГММ тестирование будет выполняться как методом серийных разведений, так и диффузионным методом.

4.1.3.3.1. Подготовка к анализу

А. Метод серийных разведений

Постановка метода серийных разведений для оценки антибиотикорезистентности включает следующие этапы:

а) приготовление растворов антибиотиков;

б) приготовление питательных сред с растворами антибиотиков;

в) приготовление суспензии исследуемого ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма, стандартизация суспензии и инокуляция;

г) инкубация;

д) интерпретация результатов исследования.

Общими и очень важными этапами в методе серийных разведений являются: приготовление растворов антибиотиков, питательных сред, смешивание растворов антибиотиков и питательных сред.

4.1.3.3.2. Приготовление растворов антибиотиков

Используют основные растворы антибиотиков (пригодные для хранения) и рабочие, используемые «ex tempore» для приготовления питательных сред.

Основные растворы антибиотиков готовят в концентрации 1 000 мкг/мл и выше. Навески антибиотиков для приготовления основных растворов готовят с учетом их активности. Расчет навески антибиотика для приготовления основного раствора проводят по формуле:

$$Вес\ (мг) = \frac{Объем\ растворителя\ (мл) \times Необходимая\ концентрация\ (мкг/мл)}{Активность\ субстанции\ (содержание\ антибиотика\ в\ мкг/мл)}$$

Из основных растворов готовят рабочие двукратные концентрации антибиотиков. Для приготовления рабочих растворов используется стерильная дистиллированная вода. Расчет навески антибиотика для приготовления основного раствора в случае, если активность антибиотика измеряется в ЕД, производится аналогично.

4.1.3.3.3. Приготовление сред, содержащих антибиотики для серийных разведений

Различают два основных варианта метода серийных разведений в бульоне: макрометод (в пробирках) и микрометод (в планшетах). Рабочие растворы антибиотиков для обоих методов готовят по одинаковой схеме. Отличием является то, что серийные разведения антибиотика делают не в дистиллированной воде, а в жидкой питательной среде. Жидкая питательная среда, прошедшая контроль качества, готовится в соответствии с инструкцией изготовителя.

При постановке методов серийных разведений проводят контроль роста культуры на среде без антибиотика, а качество среды и антибиотиков контролируют с использованием референтных штаммов данного вида. Контролируется также чистота суспензии ГММ, использованного для инокуляции, путем высева на неселективные среды.

4.1.3.3.4. Учет результатов

Учет результатов при постановке макро- и микрометодов проводят визуально по появлению видимой мутности или спектрофотометрически. За МПК принимают концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста.

Б. Дискодиффузионный метод

Постановка дискодиффузионного метода оценки антибиотикорезистентности включает следующие этапы:

- приготовление питательных сред;
- приготовление суспензии микроорганизма и инокуляция;
- наложение дисков;
- инкубация;
- учет результатов.

Для получения правильных результатов необходимо жестко соблюдать правила хранения и использования коммерческих дисков.

4.1.3.3.5. Приготовление питательных сред

Приготовление чашек Петри с плотной питательной средой связано с некоторыми особенностями. Плотную питательную среду готовят в соответствии с инструкцией изготовителя. Перед заполнением чашки Петри расплавленной питательной средой ее устанавливают на строго горизонтальную поверхность, выверенную по уровню. Толщина агарового слоя должна быть 4,0 мм, что достигается при внесении в чашку Петри диаметром 100 мм 25—30 мл агаровой среды. Соблюдение указанных требований связано с тем, что размер и форма зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Перед инокуляцией суспензии чашки с плотной питательной средой контролируют на отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

4.1.3.3.6. Приготовление суспензии и инокуляция

Для приготовления инокулята используют 18—20 часовую агаровую или 5—6 часовую бульонную культуру исследуемого ГММ. Суспензию доводят до мутности стандарта McFarland 0,5 (конечная концентрация около $1—2 \times 10^7$ КОЕ/см^3).

Приготовленный инокулят в количестве 1—2 мл вносят на поверхность чашки Петри, равномерно по поверхности агара распределяют покачиванием. Избыток сус-

пензии удаляют пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10—15 минут.

4.1.3.3.7. Наложение дисков

Через 15—20 минут после инокуляции на поверхность питательной среды вносят диски с антибиотиками. Диски наносят с помощью автоматического распределителя дисков или стерильным пинцетом. На одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с расстоянием между краем чашки и диска, а также между дисками 15—20 мм. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

4.1.3.3.8. Инкубация и учет результатов

Чашки после наложения дисков помещают в термостат и инкубируют, перевернув их вверх дном, 18—20 часов при оптимальной температуре для исследуемого ГММ.

После окончания инкубации проводят учет результатов, измеряя диаметр зоны задержки роста с точностью до 1 мм. Для этого пользуются штангенциркулем или кронциркулем, раздвигая их концы до видимой зоны задержки роста и затем, измеряя зону задержки в мм с помощью линейки.

4.2. Определение патогенных свойств ГММ, штамма-реципиента и референтного (контрольного) штамма

При выявлении четко выраженной гемолитической и адгезивной активности ГММ и штамма-реципиента обязательными тестами на патогенные свойства ГММ и штамма-реципиента являются определение вирулентных свойств ГММ и штамма-реципиента с использованием тканевых культур (HeLa, Hep-2, CHO), определением LD_{50} на модели беспородных мышей, интраназальной легочной модели, инвазивных свойств на тканевых культурах и в кератоконъюктивальном тесте по Sereny. В зависимости от принадлежности ГММ и штамма-реципиента к определенному виду микроорганизмов выбираются наиболее адекватные методы определения вирулентных и инвазивных свойств ГММ. Ниже приведены методы, которые могут быть использованы в микробиологической и молекулярно-генетической оценке ГММ при приведенных выше условиях.

4.2.1. Определение гемолитической активности ГММ и штамма-реципиента

Определенные виды микроорганизмов продуцируют гемолизины, считающиеся факторами патогенности у бактерий, в связи с чем продукция гемолизина во многих случаях является маркером вирулентности. Определение гемолитической активности проводится в 2 этапа. На 1-м этапе на 5 %-ный кровяной агар высевают исследуемый ГММ и штамм-реципиент. При продукции гемолизина через 18—24 часа при культивировании чашек Петри при оптимальной температуре развития гемолиза исследуемым ГММ вокруг колоний образуется видимая зона гемолиза и тем большая, чем больше гемолизина продуцирует ГММ и штамм-реципиент. При выявлении продукции гемолизина ГММ и штаммом-реципиентом проводят 2-й этап исследования, определяя титр гемолитической активности супернатантов ГММ и штамма-реципиента.

4.2.2. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды, используемые для определения патогенных свойств ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма вида, к которому относится ГММ

4.2.2.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений РН ± 0,01	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Баня водяная с подогревом	ГОСТ 12026—76
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72
Холодильник бытовой электрический	
Микроцентрифуга типа «Эппендорф»	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Штативы для пробирок	

4.2.2.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Бутыли стеклянные для химических реактивов	
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
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Ступка фарфоровая с пестиком	ГОСТ 9147—80

Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Микробиологические петли	
Фломастеры-маркеры	

4.2.2.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ)
Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
D-глюкоза, ч	ГОСТ 6038—79
D-манноза хч	ТУ 6-09-22-98—79
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4328—77
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Экстракт дрожжевой	
Триптон	
Селективные питательные среды для конкретного ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма: мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов;	ТУ 9229-083-00419785—97
для определения энтеробактерий;	ТУ 9229-072-00419785—97
для определения дрожжей и микроскопических	ТУ 9229-083-00419785—97
грибов (агар Сабуро, сывороточный и др.);	ГОСТ 10444.12—88
для определения S. aureus	ГОСТ 10444.1, п. 5.1, п. 5.4
(типа Байд-Паркера, солевой агар);	
для выращивания бифидобактерий,	ТУ 10-02-02-789-192-95
молочнокислых и пропионово-кислых бактерий (ГМС, М17, MRS)	
Дезинфицирующий раствор	
Микробиологические петли	
стандарт мутности по McFarland	
5 % взвесь эритроцитов человека, барана, кролика, морской свинки	

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь сертификат качества ИСО 9000 или EN 29 000.

Питательные среды и препараты отечественного производства должны соответствовать нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

4.2.2.4. Проведение анализа

Взвесь эритроцитов человека, барана или другого вида млекопитающего добавляют к охлажденной до 50—55 °С плотной питательной среде с таким расчетом, чтобы взвесь эритроцитов составляла в агаре 5 %. Смесь аккуратно перемешивают и разливают в чашки Петри. После застывания агара и подсушивания чашек на поверхность 5 %-ного кровяного агара высевают в разведениях культуру ГММ или штамма-реципиента для формирования отдельных колоний. После посева чашки инкубируют в зависимости от вида микроорганизма в течение 24—48 часов при оптимальной для него температуре развития. Затем чашки Петри вынимают из термостата и осуществляют учет результатов. При продукции ГММ и штаммом-реципиентом гемолизина вокруг колоний формируются зоны гемолиза и тем большие, чем больше гемолизина продуцируют ГММ и штамм-реципиент.

При выявлении феномена продукции гемолизина ГММ и штаммом-реципиентом с колонии петлей осуществляют взятие материала, который высевают в пробирку с 3 мл обогащенной жидкой питательной среды (например, содержащую триптон, дрожжевой экстракт, аминокислоты). Пробирки инкубируют в течение 24—48 часов при оптимальной для ГММ температуре, после чего выращенные бактериальные клетки центрифугируют в центрифуге при 6 000 об./мин в течение 15 минут. Супернатант аккуратно отбирают наконечником микропипетки и переносят в чистую пробирку. Затем готовят 1 %-ную взвесь эритроцитов барана или человека и разливают в пробирки по 1 $см^3$ (макрометод) или в U-лунки планшет по 0,1 $см^3$ (микрометод). Добавляют равный объем супернатанта исследуемого ГММ и штамма-реципиента. Инкубируют в течение 1 часа при 35—37 °С и производят предварительный учет результатов. Окончательный учет результатов осуществляют через 18—24 часа инкубации смеси эритроцитов и супернатанта при температуре 18—20 °С.

При положительном результате наблюдается гемолиз эритроцитов, представляющий визуально окрашенный прозрачный бульон. Последняя пробирка или лунка, в которой наблюдается гемолиз отражает титр (количество) гемолизина, продуцируемого ГММ или штаммом-реципиентом. При отрицательном результате на дне пробирки или лунки формируется «пуговка» эритроцитов без изменения цвета бульона. Контроли: отрицательный – вместо супернатанта добавляется равный объем стерильного бульона, в котором проводилось выращивание культур; положительный – штамм гемолизпродуцирующей кишечной палочки, выращиваемый в тех же условиях, что и ГММ и штамм-реципиент.

4.3. Определение адгезивности ГММ и штамма-реципиента

Для пробиотиков определение адгезивности ГММ и штамма-реципиента является обязательным методом в микробиологической и молекулярно-генетической оценке ГММ, используемых в производстве пищевых продуктов. Для остальных видов ГММ определение адгезивности осуществляется на основании предварительного анализа справочных и нормативных документов, поступающих на экспертизу вместе с ГММ и штаммами-реципиентами.

Адгезивные свойства ГММ могут быть исследованы на ряде биологических моделей (развивающиеся куриные эмбрионы, энтерально зараженные мыши-сосунки, перевязанная петля тонкого кишечника кроликов) и методом гемагглютинации эритроцитов человека или животных. Наиболее простым и универсальным методом определения адгезивных свойств бактерий является выявление способности микроорганизмов вызы-

вать гемагглютинацию эритроцитов человека и животных. В связи с этим адгезивность ГММ и штамма-реципиента первоначально будет определяться методом гемагглютинации. При выявлении способности ГММ и штамма-реципиента агглютинировать эритроциты человека и животных далее, в зависимости от вида ГММ, будет использоваться одна из биологических моделей на животных.

4.3.1. Определение адгезивности ГММ, штамма-реципиента и референтного штамма в отсутствии D-маннозы

Адгезивные свойства ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма первоначально определяются методом гемагглютинации эритроцитов человека или животных (мыши, крысы, кролика, барана и др.) в отсутствии D-маннозы (маннозочувствительная адгезия). При этом метод может выполняться в макро- (пробирках) и микровариантах (планшетах).

Выполнение метода включает следующие этапы:

- приготовление взвеси эритроцитов;
- приготовление суспензии микроорганизма;
- внесение в пробирки или в лунки планшет взвеси эритроцитов;
- внесение в пробирки или в лунки планшет суспензии культуры ГММ;
- аккуратное перемешивание смеси эритроцитов и суспензии культур;
- инкубация в термостате при 37 °С в течение 1 часа;
- предварительный учет результатов;
- инкубация смеси эритроцитов и суспензии микроорганизма при комнатной температуре в течение 18 часов;
- окончательный учет результатов.

Постановка реакции гемагглютинации с эритроцитами человека или животных включает следующие этапы.

Приготовление взвеси эритроцитов. Из тщательно отмытых эритроцитов готовят 1 %-ную взвесь в стерильном физиологическом растворе. С этой целью к 1 $см^3$ эритроцитов, помещенных в 200 $см^3$ колбу добавляют 99 $см^3$ стерильного физиологического раствора. Взвесь аккуратно перемешивают до образования однородной суспензии.

Приготовление суспензии ГММ. ГММ, выращенный на плотной питательной среде, смывают стерильным физиологическим раствором и готовят суспензию клеток в концентрации 1×10^9 КОЕ/$см^3$, используя стандарты мутности, выпускаемые ГИСК им. Тарасевича или стандарт McFarlane (N1-7).

Приготовленную 1 %-ную взвесь эритроцитов вносят по 1 $см^3$ в пробирки или по 0,1 $см^3$ в лунки планшет с U-дном. Далее в тех же количествах вносят суспензию ГММ и взвесь аккуратно перемешивают. Пробирки закрывают пробками, планшет крышкой и помещают в термостат при температуре оптимальной для исследуемого вида ГММ на 1 час. После инкубации пробирок или планшета в термостате их вынимают и проводят предварительный учет результатов. При наличии адгезивных свойств у ГММ эритроциты распределяются равномерно по всей поверхности дна. При отрицательном результате все эритроциты собираются в виде точки в середине дна пробирки или лунки планшета. Окончательные результаты исследования учитывают через 18 часов после инкубации пробирок или планшета при комнатной температуре.

4.3.2. Определение адгезивности ГММ, штамма-реципиента и референтного штамма в присутствии D-маннозы

При выявлении выраженной гемагглютинационной активности ГММ или штамма-реципиента ту же реакцию проводят с использованием d-маннозы для определения маннозо-чувствительной или маннозорезистентной адгезии. Постановка метода в данном варианте проводится аналогично пункту 4.3.1, к которому добавляется ряд пробирок или лунок, в которые внесена 1 % D-манноза. В случае маннозо-чувствительной гемагглютинации (адгезии) наблюдается оседание эритроцитов в виде точки в середине дна пробирки или лунки. Маннозо-устойчивая гемагглютинация наблюдается и при добавлении d-маннозы в реакционную взвесь.

При выявлении гемолитической и адгезивной активности у ГММ и штамма-реципиента в экспериментах in vitro необходимы исследования на экспериментальных моделях in vivo.

4.4. Определение вирулентности ГММ, штамма-реципиента и референтного (контрольного) штамма

4.4.1. Аппаратура, материалы и инструментарий

4.4.1.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-2, МБИ-3, МБР-3	ГОСТ 8284—78
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150	ТУ 16-535—84
или других видов	
Холодильник бытовой электрический	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Шприцы медицинские 1 или 0,1 $см^3$	
Штативы для пробирок	

4.4.1.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75

Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Микробиологические петли	

4.4.1.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ)
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
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4328—77
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Питательный бульон	ТУ 10-02-02-789-176—94
Сухая питательная среда для определения чувствительности к антибиотикам диффузионным методом	ГОСТ 51600—2000
Питательные среды для определения	ТУ 9229-072-00419785—97
энтеробактерий	ГОСТ 29184—91
Среды для определения дрожжей и	ТУ 9229-083-00419785—97
микроскопических грибов (агар Сабуро, сывороточный и др.)	ГОСТ 10444.12—88
Среды для определения S. aureus	ГОСТ 10444.1, п. 5.1, п. 5.4
(типа Байд-Паркера, солевой агар)	
Среды для выращивания бифидобактерий	ТУ 10-02-02-789-192—95
молочнокислых и пропионово-кислых бактерий (ГМС, М17, MRS)	
Дезинфицирующий раствор	
Микробиологические петли, скальпель	

4.4.2. Описание метода

Группам мышей, по 10 животных каждая, вводят внутрибрюшинно по 0,1 $см^3$ живой культуры ГММ, штамма-реципиента или контрольного штамма в концентрации 1×10^9, 1×10^7, 1×10^5 и 1×10^3 КОЕ/$см^3$. Каждую группу животных помещают в отдельную клетку и далее наблюдают в течение 10 дней за гибелью животных.

В качестве контролей используют группы животных (по 10 шт.), которым внутрибрюшинно вводят: а) стерильный физиологический раствор и б) вирулентный штамм определенного вида с установленной ранее дозой LD_{50}.

4.4.3. Учет результатов

По завершении срока наблюдения подсчитывают гибель животных в каждой группе.

LD_{50} рассчитывают по формуле:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \delta\,(\Sigma L_i - 0{,}5), \text{ где}$$

N – общее число испытанных доз;

n – число животных, которым введена каждая доза;

δ – логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей, т. е. логарифм кратности испытанных разведений;

L_i – отношение числа животных, погибших от введения данной дозы, к общему числу животных, которым эта доза введена, индекс i соответствует номеру дозы, если считать наименьшую из испытанных доз первой;

ΣL_i – сумма значений L_i, найденных для всех испытанных доз;

D_i – величина дозы (номер i);

D_N – максимальная,

D_1 – минимальная из испытанных доз.

ГММ и штамм-реципиент считаются авирулентными, если LD_{50} равна 5×10^8 КОЕ/см^3 и более.

При идентичных показателях LD_{50} у ГММ и штамма-реципиента можно считать, что осуществленная генетическая модификация не повлияла на вирулентные свойства ГММ.

4.5. Определение адгезивности ГММ и штамма-реципиента in vivo

При подтверждении гемагглютинационной активности ГММ или штамма-реципиента с использованием d-маннозы возможно количественное определение адгезии in vivo при использовании биологических моделей (развивающиеся куриные эмбрионы, энтерально зараженные мыши-сосунки, перевязанная петля тонкого кишечника кроликов). Ниже приведено описание модели для исследования адгезивной активности штаммов микроорганизмов на модели перевязанной петли тонкого кишечника 12—14-дневных крольчат.

4.5.1. Материалы и инструментарий

4.5.1.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Микроскоп биологический МБИ-2, МБИ-3, МБР-3	ГОСТ 8284—78
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150	ТУ 16-535—84
или других видов	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель медицинский хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89

Шприцы медицинские 1 или 0,1 $см^3$

Штативы для пробирок

4.5.1.2. Животные и штаммы

12—14-дневные крольчата

Культура ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма того же вида, что и ГММ

4.5.2. Сущность метода

В каждый опыт берут не менее 3 крольчат. Животных фиксируют на специальном столе и внутримышечно во внутреннюю область бедра вводят тиопентал натрия (0,1 мл 1 %-ного раствора на 50 г веса животного). Наркотический эффект наступает через 2—3 минуты. По средней линии живота крольчонка делают разрез брюшины по 1 см в обе стороны от пупка. Извлекают петли дистального отдела тонкого кишечника и в его просвет на расстоянии 3—5 см от уровня верхушки аппендикса, имеющего общую брыжейку с подвздошной кишкой, вводят с помощью иглы шприца (1,0 $см^3$) 0,1 мл микробной взвеси, содержащей 10^8 КОЕ/$см^3$. Одновременно делают 10-кратные разведения взвеси ГММ и из 3, 4 и 5-го разведений производят посевы по 0,5 мл на плотную питательную среду, делая параллельные высевы по 2 чашки Петри на каждое разведение.

Через 1,5 часа после заражения животных усыпляют хлороформом и вскрывают. Отступя 5—7 см от слепой кишки, извлекают участок подвздошной кишки длиной 20 см и переносят в чашку Петри. Чтобы предупредить элиминацию ГММ со слизистой кишечника исследуемый материал помещают на лед и дальнейшие процедуры проводят оперативно. Отрезки кишечника разрезают вдоль, трижды промывают в охлажденном при 4 °С растворе 0,9 %-ного хлористого натрия, растирают в ступке или специальном гомогенизаторе. К растертой ткани добавляют 1 мл 0,9 %-ного раствора хлористого натрия и полученные суспензии переносят в пробирки и делают 10-кратные разведения. Из 3, 4, 5-го разведений делают посевы по 0,5 мл на плотную питательную среду, делая параллельные высевы по 2 чашки Петри на каждое разведение. Через 18—24 часа после инкубации при температуре оптимальной для выращивания исследуемого вида ГММ подсчитывают число выросших колоний, изолированных со слизистой тонкого кишечника и высеянных непосредственно из пробирки до заражения кроликов. Таким образом, определяется число ГММ, прикрепившихся к слизистой тонкого кишечника.

4.5.3. Учет и интерпретация результатов

Коэффициент адгезии для количественной оценки адгезивной активности ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма высчитывают по следующей формуле:

$$K = \frac{в}{а} \cdot 100\,\%\text{, где}$$

K – коэффициент адгезии – процент адгезивных ГММ в популяции исследуемого штамма;

$а$ – число жизнеспособных ГММ, введенных в кишечник крольчат;

$в$ – число ГММ, прикрепившихся к стенке кишечника.

По степени адгезивности ГММ они оцениваются следующим образом:

а) высокоадгезивные с коэффициентом адгезии 3,0 и выше, б) адгезивные – от 1 до 3 и в) слабоадгезивные – 0,001—0,9. Слабоадгезивные штаммы, как правило, авирулентны, а адгезивные и высокоадгезивные штаммы, обычно, обладают определенными вирулентными свойствами.

Оценка ГММ осуществляется по двум показателям: 1) он должен иметь коэффициент адгезии не более чем 0,9 и 2) коэффициент адгезии ГММ должен быть равен или быть меньше коэффициента адгезии штамма-реципиента. При показателях коэффициента адгезии выше 1,0 требуются молекулярно-генетические исследования на выявление генов адгезии у ГММ и штамма-реципиента.

4.6. Определение инвазивности ГММ и штамма-реципиента

Инвазивность грамотрицательных бактерий тестируют с помощью кератоконъюктивальной пробы. Сущность метода заключается в том, что возбудитель проникает в эпителиальные (инвазирует их) клетки конъюктивы, а затем в роговицу и размножается в них, вызывая, очаговое, а затем и сплошное разрушение ткани.

4.6.1. Материалы и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель медицинский, хирургический 15 см	ГОСТ 21240—89
Микропипетки типа «Ленпипет» переменного объема 0,5—10 мкл, 5—40 мкл, 40—200 мкл, 200—1 000 мкл	ТУ 9452-002-33189998—02
Наконечники для микропипеток	
Шприцы медицинские 1 $см^3$ или 0,1 $см^3$	
Штативы для пробирок	

4.6.1.1. Животные и штаммы

Морские свинки

Культура ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма того же вида, что и ГММ

Выращенные на селективной для данного вида микроорганизма плотной или жидкой питательной среде клетки ГММ и штамма-реципиента трижды отмывают в стерильной дистиллированной воде и готовят взвесь по стандарту McFarland или стандартам мутности ГИСК им. Тарасевича в концентрации 1×10^8 КОЕ/$см^3$ · 0,1 $см^3$ приготовленной таким образом взвеси вносят в конъюнктиву глаза. Со второго дня после введения в течение 14 дней проводят визуальное исследование поражений конъюктивы

и роговицы глаза. У штаммов, обладающих низкой вирулентностью поражения роговицы, носящие обратимый характер, наблюдаются в более поздние сроки.

Контроль: отрицательный – 0,1 мл в конъюктиву глаза стерильной дистиллированной воды; положительный – 0,1 мл в конъюктиву глаза вирулентной культуры возбудителя дизентерии – S. flexneri или S. sonei.

4.6.2. Учет результатов

ГММ, штамм-реципиент и контрольный (референтный) штамм того же вида, что и ГММ не должны вызывать поражения конъюктивы и роговицы. В случае выраженных инвазивных свойств выносится отрицательное заключение о возможности использования ГММ в производстве пищевых продуктов.

4.7. Определение антагонистической или симбиотической активности ГММ и штамма-реципиента с представителями резидентной микрофлоры кишечника человека

Определение взаимодействия ГММ и штамма-реципиента с резидентной микрофлорой кишечника человека является обязательным для пробиотиков, а также микроорганизмов, входящих как компоненты пищевых продуктов (например, кисломолочная продукция). Для других представителей ГММ данное исследование выполняется по решению экспертного Совета, выполняющего микробиологическую и молекулярно-генетическую оценку ГММ и штамма-реципиента.

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

4.7.1.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Баня водяная с подогревом	ГОСТ 12026—76
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-2, МБИ-3, МБР-3	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72

Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150	ТУ 16-535—84
или других видов	
Холодильник бытовой электрический	
Штативы для пробирок	
Микроволновая печь для быстрого плавления плотных питательных сред	

4.7.1.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Бутыли стеклянные для химических реактивов	
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
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С (цена деления шкалы 1 °С)	ГОСТ 13646—68
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Микробиологические петли	

4.7.1.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ)
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
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4328—77
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 31739—78
Набор реактивов для окраски по Граму	
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Экстракт дрожжевой*	

* Производства разных фирм, прошедшие государственную регистрацию и разрешенные к использованию.

Триптон*	
Антибиотики разных групп*	
Диски с антибиотиками*	

Питательные среды:

Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов	ТУ 9229-083-00419785—97
Питательный бульон	ТУ 10-02-02-789-176—94
Питательные среды для определения	ТУ 9229-072-00419785—97
энтеробактерий	ГОСТ 29184—91
Среды для определения дрожжей и	ТУ 9229-083-00419785—97
микроскопических грибов (агар Сабуро, сывороточный и др.)	ГОСТ 10444.12—88
Среды для определения S. aureus	ГОСТ 10444.1, п. 5.1, п. 5.4
(типа Байд-Паркера, солевой агар)	
Среды для выращивания бифидобактерий	ТУ 10-02-02-789-192—95
молочнокислых и пропионово-кислых бактерий (ГМС, М17, MRS)	
Планшеты для идентификации культур производства разных фирм, прошедшие государственную регистрацию в установленном порядке и разрешенные к использованию	
Реактивы для ряда тестов в зависимости от идентифицируемого вида ГММ	
Стандарт мутности по McFarland	

4.7.1.4. Штаммы

ГММ, штамм-реципиент, контрольный (референтный) штамм того же вида, что и ГММ
Контрольные (референтные) штаммы, представляющие основные виды резидентной микрофлоры человека:
Грамположительные облигатно-анаэробные бактерии
Лактобактерии
Бифидобактерии
Пептострептококки
Грамотрицательные облигатно-анаэробные бактерии
Бактероиды
Факультативно-анаэробные микроорганизмы
Кишечная палочка

Стафилококки

Стрептококки

Дрожжеподобные грибы рода Candida

Контрольные штаммы, используемые в настоящем разделе, должны иметь паспортные данные и принадлежать к Американской типовой коллекции культур (АТСС) или получены из музея живых культур Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича.

Допускается использование других разрешенных питательных сред и диагностических тест-систем аналогичного назначения для проведения исследований фенотипических свойств в соответствии с данным документом. При их применении необходимо руководствоваться рекомендациями изготовителя.

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь сертификат качества ИСО 9 000 или EN 29 000.

Питательные среды и препараты отечественного производства должны соответствовать нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

4.7.2. Сущность метода

Из выращенных на плотных или жидких питательных средах контрольных штаммов и ГММ, штамма-реципиента и референтного штамма того же вида, что и ГММ готовят взвеси микроорганизмов с определенными концентрациями КОЕ/мл. Далее готовят ряды пробирок с жидкой питательной средой по 3 мл, на которой способны расти все исследуемые микроорганизмы (например, триптиказо-соевый или L-бульон) и вносят по 0,5 мл 10^1, 10^3 и 10^5 КОЕ/см^3 ГММ и такое же количество клеток контрольного штамма (например, Bifidobacterium). Одновременно осуществляют посевы на селективные питательные среды в разведениях для точного подсчета клеток каждого вида микроорганизма. Например, для точного подсчета количества клеток стафилококков посев осуществляется на желточно-солевой агар при дальнейшем культивировании при 37 °С в течение 48 часов в аэробных условиях, в то время как для определения количества клеток бифидобактерий взвесь микроорганизмов высевается на модифицированную среду Блоурока, а культивирование производят в анаэробных условиях при 37 °С в течение 48 часов.

Через 6 и 24 часов осуществляют посевы на селективные питательные среды и подсчитывают число клеток представителя резидентной микрофлоры и ГММ. Контролями служат посевы, в которых выращивается только представитель резидентной микрофлоры или ГММ. Вычисляется число клеток представителя резидентной микрофлоры, выращенного в присутствии ГММ и отдельно. При приблизительно одинаковом соотношении числа выросших клеток отдельно и в присутствии ГММ можно считать, что ГММ не обладает антагонистическим действием. При более высоких показателях числа выросших клеток обоих видов, чем при выращивании каждого из представителей в отдельности, можно констатировать, что оба вида характеризуются симбиотическим действием. При превышении количества клеток представителя резидентной микрофлоры в 5 и более раз, выращенного без ГММ, чем в смеси с ГММ, можно полагать антагонистическое действие ГММ на конкретного представителя нормальной микрофлоры кишечника. В случае, если такое антагонистическое действие ГММ проявляется ко всем или большинству из исследованных представителей нормальной микрофлоры кишечника человека, делается заключение о невозможности его использования в производстве пищевых продуктов. При выявлении антагонистического действия ГММ к 1—2 представителям нормальной микрофлоры кишечника человека требуются дополни-

тельные исследования, включающие исследование антагонистической активности ГММ и штамма-реципиента с представителями резидентной микрофлоры кишечника человека in vivo, молекулярно-генетические исследования по выявлению генов, детерминирующих данный феномен.

5. Молекулярно-генетическая оценка ГММ, используемых для производства пищевой продукции

Необходимость проведения тех или иных исследований по данному разделу и для каждого конкретного вида пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, определяется экспертом центра по микробиологической и молекулярно-генетической экспертизе ГММ при ГУ НИИЭМ им. Гамалеи РАМН. Это обусловлено большим разнообразием последовательностей чужеродной ДНК, которые могут быть встроены в геном ГММ. Эксперт обязан проанализировать представленную заявителем документацию, соответствующие базы данных (в т.ч. и международные) и составить перечень необходимых исследований в зависимости: 1) от сложности конструкции ГММ; 2) характера и места использования ГММ в технологии получения пищевых продуктов; 3) вероятности попадания живых ГММ в организм человека.

Для точной идентификации таксономического положения и свойств ГММ (при необходимости – штаммов-доноров и реципиентов), фирма-заявитель должна представить паспорт штамма и/или справку о депонировании в национальных или иных международно признанных коллекциях культур микроорганизмов, в коллекциях научно-исследовательских организаций с указанием:

1) наименования штамма в соответствии с действующей международной номенклатурой (род, вид, номер штамма);

2) источника выделения;

3) сведений, подтверждающих безопасное использование данного штамма и/или продуктов, выработанных с его применением, в питании людей – Инвентарный перечень GRAS FDA, свидетельства о свободной продаже в стране-изготовителе); для штаммов-продуцентов ферментных препаратов и пищевых веществ – сведения о соответствии штамма СанПиН 2.3.2.1293—03 «Гигиенические требования к применению пищевых добавок», Перечню Комиссии Кодекс Алиментариус, General Requirements, V. 1A;

4) сведений о непатогенности и нетоксигенности;

5) сведений о стабильности генома;

6) сведений о профиле антибиотико-резистентности;

7) сведений о резистентности к кислоте и желчи (для пробиотиков);

8) способности к симбиозу с резидентной микрофлорой ЖКТ (для пробиотиков);

9) способности к адгезии (для пробиотиков);

10) способности к продукции биологически активных субстанций;

11) способности к иммуностимулирующему эффекту (для пробиотиков).

Для подтверждения таксономического положения штамма заявитель должен представить информацию об уровне гомологии ГММ (в случае необходимости штаммов-донора и реципиента) с штаммами этого вида, допущенными для использования в пищевой промышленности при создании аналогичной продукции. Также должны быть предоставлены данные сравнения фенотипических свойств ГММ с характерными фенотипическими свойствами его вида, описанными в определителе Берги (Bergey's manual of systematic bacteriology. Eds. Sneaht P.N.D. et al. Baltimore; Williams and Wilkins, V. 2, 1986).

Заявитель (поставщик) должен представить информацию о нуклеотидной последовательности генной вставки, а также материалы, отражающие молекулярно-биологические характеристики ГММ (см. п. 3.3 настоящих МУК).

5.1. ПЦР-идентификация чужеродного генетического материала в штаммах ГММ

Согласно рекомендациям ФАО/ВОЗ стратегия выявления генетических модификаций у микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов, должна быть направлена на выявление максимального количества потенциальных рисков. Поэтому экспертные исследования штаммов ГММ должны включать, с одной стороны, подтверждение природы штамма-реципиента и целевой вставки чужеродной ДНК (согласно представленной заявителем документации), а с другой стороны, выявлять наличие возможных генетических модификаций, не указанных в документации. Рекомендуемые стратегии выявления генетических модификаций предлагают использовать для этих целей наиболее часто употребляемые векторные последовательности: селективные гены (гены антибиотико-резистентности, бактериоцинов или ауксотрофные селективные маркеры), неэкспрессируемые последовательности (полилинкеры, промоторы или терминаторы), а также последовательности мигрирующих элементов. Обнаружение таких последовательностей будет свидетельствовать о возможных незадокументированных генетических модификациях, что потребует проведения дополнительных исследований штаммов ГММ. С точки зрения безопасности пищевые ГММ не должны содержать гены антибиотико-резистентности, встроенная ДНК не должна кодировать выработку потенциально опасных веществ, а векторы класса food-grade должны быть сконструированы таким образом, чтобы свести к минимуму вероятность передачи нового генетического материала другим микроорганизмам. Проведение дополнительных исследований может потребовать использования таких методов как различные виды гибридизационного и рестрикционного анализа, секвенирование, анализ функционирования вставки (ОТ-ПЦР и изучение продукции белка чужеродной ДНК). Однако основным скрининговым методом является полимеразная цепная реакция – ПЦР. Специально подобранные пары праймеров будут использованы как для проверки целевого гена, так и для последовательностей, свидетельствующих о возможных генетических модификациях.

В настоящее время методы молекулярной биологии, основанные на ПЦР-анализе, находят все более широкое применение в целях диагностики и экспресс-анализа разнообразного биологического материала. Преимущество подобных методик обусловлено высокой чувствительностью и специфичностью ПЦР, совместимостью ПЦР-анализа с дополнительными методами исследования (секвенирование, рестрикционный и гибридизационный анализы амплифицированных фрагментов, изучение информационных РНК (ОТ-ПЦР) и транслируемого ими белкового продукта). Достоинством ПЦР-анализа являются также высокая воспроизводимость результатов, технологичность проведения анализа в сочетании с доступностью и сравнительно невысокой стоимостью оборудования для организации ПЦР-лабораторий.

5.1.1. Метод идентификации целевых генов, неэкспрессируемых последовательностей и селективных маркеров, а также подтверждение видовой принадлежности штамма, при помощи ПЦР

5.1.1.1. Создание электронной базы данных

Для полной и надежной идентификации конкретного ГММ необходимо создать электронную базу данных о целевых, селективных и маркерных генах, мигрирующих элементах, неэкспрессируемых последовательностях и регуляторных элементах, а также векторных конструкциях класса food-grade, которые используются при создании ГММ. В такую базу данных должна быть включена информация о видоспецифических генах, которые могут быть использованы для подтверждения таксономической принадлежности штамма. Также в базу данных должны быть включены сведения о наличии в коллекциях штаммов ГММ, принадлежащих к 1, 2 и 3 классу безопасности, в различных странах.

Особое внимание при создании электронной базы данных следует уделить информации о так называемых GRAS (generally recognized as safe) микроорганизмах, которые чаще всего используются как доноры генетической информации при конструировании ГММ.

5.1.1.2. Выбор праймеров

Для проведения экспертизы ГММ выбор праймеров должен проводиться по следующим позициям:

1) для идентификации таксономической принадлежности микроорганизма (гены 16S/23S рРНК или другие специфические последовательности);

2) для идентификации целевых генов генетической вставки (гены, кодирующие продукцию технологически важных ферментов, например, таких как химозин; гены устойчивости к бактериофагам; гены-регуляторы уровня кислотности; гены устойчивости к этанолу и другим стрессовым факторам);

3) для идентификации генов селективных маркеров (гены устойчивости к антибиотикам, бактериоцинам, ауксотрофным селективным маркерам);

4) для идентификации маркерных (screenable) векторных генов (гены E. coli, кодирующие β-галактозидазу или β-глюкоронидазу или гены бактериофага T7, кодирующие РНК полимеразу);

5) для идентификации неэкспрессируемых последовательностей (полилинкеры, промоторы и терминаторы);

6) для идентификации мигрирующих элементов, используемых для создания транспозируемых векторов (например, Ту-элементы).

Выбор праймеров должен осуществляться в соответствии с правилами молекулярного дизайна. Для выбора праймеров должны быть использованы программы Primer, Oligo или другие аналогичные программы, позволяющие осуществлять многофакторный анализ выбранных последовательностей. Должен быть произведен сравнительный анализ выбранных олигонуклеотидов с помощью программы Blast для исключения наличия областей гомологии с ДНК родственных и неродственных видов.

Конкретный набор тех или иных праймеров для проведения экспертизы должен определяться таксономической принадлежностью штамма; информацией о его генетическом статусе и характере генетических модификаций, предоставленной заявителем; а также характера и места использования ГММ в технологии получения пищевых продуктов и вероятности попадания живых ГММ в организм человека (см. п. 3.4 настоящих МУ). Выбор, синтез и очистка праймеров производится в Центре по микробиоло-

гической и молекулярно-биологической экспертизе ГММ при ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН.

5.1.1.3. Выбор условий проведения ПЦР

Условия проведения реакции определяют степень точности и воспроизводимости результатов и их отработка должна производиться для каждой конкретной пары праймеров. Выбор условий проведения ПЦР включает подбор оптимального соотношения компонентов реакционной смеси, структуры программы амплификации (временных и температурных характеристик каждого этапа амплификации) и адекватного метода детекции результатов. Выбор оптимальных условий проведения ПЦР обеспечивает высокий уровень чувствительности и специфичности прохождения реакции, исключающий наличие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК. Выбор оптимальных условий проведения ПЦР осуществляется сотрудниками Центра по микробиологической и молекулярно-биологической экспертизе ГММ при ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН.

5.1.1.4. Выделение ДНК из культур ГММ и проведение ПЦР

5.1.1.4.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Программируемый термостат (ДНК-амплификатор) типа «Терцик МС2» или аналоги	
Термостат, поддерживающий температуру 45 °С, для пробирок объемом 1,5 мл	
Центрифуга со скоростью вращения ротора 8 000—12 000 об./мин для пробирок, вместимостью 1,5 и 0,5 мл типа «Эппендорф»	
Прибор для горизонтального электрофореза	
Встряхиватель вибрационный (типа «Вортекс»)	
Водяная баня с подогревом	ГОСТ 12026—76
Ультрафиолетовый трансиллюминатор	
Холодильная камера на – 20 °С	
Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками на 1—10, 5—40, 40—200, 200—1 000 мкл типа «Ленпипет»	

5.1.1.4.2. Лабораторная посуда и материалы

Пробирки типа «Эппедорф», вместимостью 1,5 мл, совместимые с центрифугой
Пробирки типа «Эппедорф», вместимостью 0,5 мл, совместимые с амплификатором
Наконечники пластиковые на 1—200 мкл к пипеткам полуавтоматическим
Наконечники пластиковые на 200—1 000 мкл к пипеткам полуавтоматическим

Перчатки резиновые	ГОСТ 3—88
Колбы плоскодонные конические разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Штативы для пробирок	

5.1.1.4.3. Реактивы

Допускаются к использованию реактивы производства различных отечественных и зарубежных фирм, прошедшие государственную регистрацию и разрешенные для использования в установленном порядке.

Трис аминометан

ЭДТА

Хлористый натрий

Бычий сывороточный альбумин

Ацетат калия

Едкий натр

β-меркаптоэтанол

Водный раствор дезоксинуклетидтрифосфатов (0,1 М)

Термостабильная ДНК-полимераза

AMV-ревертаза (обратная траснскриптаза)

Бромфеноловый синий

Агароза для электрофореза

Бромистый этидий

Ледяная уксусная кислота

Вода деионизованная	ГОСТ 6709—72
Масло вазелиновое	ГОСТ 3164—78

5.1.1.4.4. Приготовление основных растворов

1 М Трис pH-7,5. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести pH до необходимого значения добавлением концентрированной HCL и довести объем до 1 л. Раствор простерилизовать.

0,5 М ЭДТА pH-8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести pH до 8,0 NaOH.

5 М NaCl (хч или чда). 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды довести объем до 100 мл, простерилизовать.

10 %-ный SDS. 10 г SDS растворить в 90 мл воды, чтобы ускорить растворение, можно нагреть раствор до 60 °С. Довести pH до 7,2 добавлением нескольких капель концентрированной HCl и довести до 100 мл. **Внимание!** *При взвешивании SDS наденьте на лицо маску, т. к. при попадании на слизистую оболочку носоглотки этот летучий порошок вызывает сильное раздражение.*

5 М Ацетат калия. 49,1 г ацетата калия растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл.

70 %-ный этанол. Для приготовления 100 мл раствора требуется 73 мл 96 % этанола и 27 мл воды.

5.1.1.4.5. Выделение ДНК из штамма ГММ

Для выделения ДНК из штамма ГММ может применяться фенол-хлороформный или другой адекватный метод. Однако наиболее надежные результаты в ПЦР дает ДНК, выделенная непосредственно перед постановкой реакции из замороженной бактериальной пасты по методу Бирнобойма и Доли:

20—40 мкл оттаявшей бактериальной массы суспендируют в 100 мкл буфера I (50 mM Трис-HCl, pH 8,0, 5 mM ЭДТА, 50 мкг/мл РНКазы). К суспензии добавляют 120 мкл лизирующего буфера (0,2 M NaOH, 1 % SDS) и ожидают лизиса бактерий, видимого по возрастанию вязкости суспензии. После этого комплекс бактериальных белков и обломков клеточной стенки осаждают добавлением 100 мкл 2,55 M ацетата калия при энергичном встряхивании на вортексе в течение 5 мин. Затем смесь центрифугируют в течение 5—10 мин. Надосадочную жидкость переносят в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,75 мл смолы марки Wizzard. Смесь тщательно перемешивают и фильтруют через мини-колонку; промывают осадок смолы в мини-колонке 2 мл 80 % изопропанола и центрифугируют 1 мин при 12 000 g для удаления остатков жидкости. Мини-колонку помещают в стерильную пробирку объемом 1,5 мл, наносят в мини-колонку 50 мкл стерильной бидистиллированной или деионизованной воды и прогревают пробирку с колонкой 5 мин при плюс 70 °С. Затем мини-колонку в пробирке помещают в центрифугу и центрифугируют 1 мин при максимальной скорости для переноса раствора ДНК в пробирку. Описанным способом получают порядка 5 мкг ДНК размером от 3 до 15 т.п.н. Полученные препараты ДНК сохраняются при минус 70 °С и используются для анализа методом ПЦР. При условии использования стерильных растворов и посуды получаемая ДНК может храниться при плюс 4 °С в течение полугода. Срок хранения препаратов ДНК при минус 20 °С превышает 2 года.

5.1.1.4.6. Проведение ПЦР

ПЦР осуществляют с помощью ДНК-амплификаторов (термоциклеров). Для проведения ПЦР используется термостабильная Taq-полимераза, соответствующий ей десятикратный ПЦР-буфер, растворы четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и выбранной пары праймеров. В типичных экспериментах реакционную смесь объемом 50 мкл составляют так, чтобы она содержала 350 нг геномной ДНК, 1,5 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1 ед. Taq-полимеразы. Затем к реакционной смеси добавляют 30 пкМ пары олигонуклеотидных праймеров в буферном растворе следующего состава: 67 мМ Трис-HCl буфер (pH 8,0 при 25 °С), содержащий 16,6 мМ сульфат аммония, 15 мМ $MgCl_2$, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 6,7 мкМ ЭДТА и бычий сывороточный альбумин в концентрации 170 мкг/мл. Далее на каждую пробу наслаивают по 50 мкл минерального масла и реакцию проводят по специально подобранным программам в многоканальном амплификаторе ДНК.

При необходимости возможно проведение мультиплексной ПЦР для анализа нескольких важных фрагментов вставки, а также второго раунда ПЦР с внутренней парой праймеров (nested PCR) для повышения специфичности реакции.

Продукты амплификации анализируют с помощью электрофореза в пластине 6 %-ного полиакриламидного геля (2,5 ч при 200 в). ДНК-маркерами служит стандартный набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322, полученный под действием рестриктазы AluI. Окрашивание фрагментов ДНК осуществляется этидиум бромидом. Анализ результатов и фотографирование электрофореграммы осуществляют в условиях ультрафиолетовой подсветки на трансиллюминаторе. Допустимо анализ продуктов ПЦР производить путем электрофореза в 2 % агарозном геле с последующей видео- или фо-

тодетекцией полученной на трансиллюминаторе картины. Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере с разрешением не менее 600 точек на дюйм, должны быть приложены к протоколу проведения испытаний.

5.1.2. Дополнительные методы идентификации генетического материала ГММ

Дополнительными и уточняющими методами идентификации генетической информации в штаммах ГММ являются рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов ДНК, а также метод определения их нуклеотидной последовательности (секвенирование).

5.1.2.1. Аппаратура и инструментарий

Допускаются к использованию аппаратура и инструментарий производства различных отечественных и зарубежных фирм, прошедшие государственную регистрацию и разрешенные для использования в установленном порядке.

1. Спектрофотометр
2. Весы аналитические
3. Планшетный ридер (rider)
4. Планшетный вошер (wosher)
5. Прибор для проведения электрофореза
6. Прибор для проведения иммуноблоттинга
7. Источник тока
8. Термостатируемый шейкер
9. Центрифуга настольная типа «Эппендорф»
10. Холодильник бытовой
11. Компьютер, монитор, сканер, принтер
12. Пипетки многоканальные и одноканальные с переменным объемом.

5.1.2.2. Методы оценки экспрессии целевого гена

Оценка экспрессии встроенного целевого гена осуществляется на двух уровнях.

Первый уровень – транскрипционный. В этом случае определяется наличие в клетке ГММ и РНК, синтезируемой под контролем целевого гена. Второй уровень – трансляционный.

В этом случае определяется наличие белкового продукта определенной молекулярной массы и/или определенной иммунноспецифичности.

5.1.2.3. Определение иРНК, транскрибируемых с целевого гена методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

1 мкг РНК, выделенной из клеток культуры ГММ, предварительно обработанной ДНКазой, отжигали с 10 пмоль одноцепочечного олигонуклеотида: 20 мин 65 °С и 10 мин при комнатной температуре. Затем проводили реакцию обратной транскрипции в общем объеме 20 мкл. Состав реакционной смеси: 1 мкг РНК с отожженным праймером, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,3; 50 мМ KCl; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ ДТТ; 1 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата; 0,5 мМ спермидина; 1 Ед AMV ревертазы. Реакцию проводили 30 мин при 42 °С. Далее эту смесь анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (методика проведения ПЦР описана в разделе 5.1.1).

5.1.2.4. Определение белка, экспрессируемого целевым геном ГММ, методом электрофоретического разделения в ПААГ – ДСН

Цель метода – сравнительный анализ белкового состава и определение молекулярной массы полипептида, экспрессируемого целевым геном.

Для проведения анализа используют следующие оборудование и реактивы.

А. Электрофоретическая камера и источник питания (типа «Биорад» или аналоги).

Б. Реактивы (производства фирм, прошедших государственную регистрацию и разрешенных к использованию в установленном порядке):

1) раствор 40\0,8 (40 % акриламида, 0,8 % бис-акриламида);
2) раствор 20\0,3 (20% акриламида, 0,3% бис-акриламида);
3) буфер разделяющего геля (БРГ), pH 8,8;
4) буфер фокусирующего геля (БФГ), pH 6,8;
5) электродный буфер, pH 8,3;
6) буфер образца;
7) раствор ДСН (додецилсульфат натрия) 10 %;
8) раствор персульфата аммония 10 %;
9) раствор для окраски гелей ERZ Blue;
10) маркеры молекулярного веса.

Проведение электрофореза

I. Приготовление гелевой пластинки:

- вымыть части прибора в детергенте;
- промыть дистиллированной водой;
- смонтировать установку для заливки гелей;
- внести разделяющий гель, полимеризация 30 мин;
- наслоить фокусирующий гель и вставить гребенку, полимеризация 10 мин.

После полимеризации (10 мин) одномоментно удалить гребенку.

Гель можно хранить в полиэтилене, целлофане при температуре 4 °С; использовать в течение 4 дней.

II. Пробоподготовка

К образцу, содержащему ~1 мг\мл белка (по поглощению при 280 нм) добавить буфер образца, прогреть при 100 °С 5 минут.

III. Электрофорез:

- поместить гелевую пластину в камеру;
- заполнить камеры буфером;
- нанести образцы микрошприцем;
- включить источник питания;
- условия: сила тока – 20 мА на пластину;
- образцы концентрируются на анодном конце, затем разделяются по молекулярной массе на основе эффекта молекулярного сита.

IV. Окраска геля

По окончании электрофореза, гель вынуть из кассеты, поместить в камеру для окраски. Окраска согласно протоколу, прилагаемому к реагенту ERZ Blue.

V. Хранение

Для консервации применяют высушивание геля между целлофановыми пленками.

Для сохранения данного изображения гель фотографируют в видимом спектре или сканируют.

5.1.2.5. Определение специфичности белка, экспрессируемого целевым геном ГММ методом иммуноблоттинга

Цель метода – идентификация экспрессируемого полипептида с помощью специфических моноклональных антител. Метод позволяет определять идентичность синтезируемого белка продукту целевого гена, указанного заявителем.

Для проведения анализа используют следующие оборудование и реактивы.

А. Электрофоретическая камера, камера для переноса и источник питания (тип «Биорад» или аналоги).

Б. Реактивы (производства фирм, прошедших государственную регистрацию разрешенных к использованию в установленном порядке).

Проведение иммуноблоттинга

I. Перенос белков

После электрофоретического разделения образца в ПААГ-ДСН осуществляю перенос белков из пластин геля на нитроцеллюлозную мембрану методом электропереноса в «полусухой» буферной системе.

Для этого на нижний угольный электрод (анод) ячейки для переноса помещаю 6 листов ватмана (№ 3), пропитанного раствором «С» (0,03 М Трис, 20 % изопропилового спирта, pH 10,0). Следующим слоем помещают PVDF-мембрану, затем накладывают пластину полиакриламидного геля с разделенными белками и 6 листов бумаги пропитанной раствором «А» (0,025 М Трис, 0,04 М ε-аминокапроновой кислоты, 20 % изопропилового спирта, 0,01 % додецилсульфата лития, pH 9,4), накладывают верхний электрод (катод) и плотно прижимают.

При сборке системы следят, чтобы между слоями не было пузырьков воздуха. Размер листов фильтровальной бумаги и нитроцеллюлозных фильтров должен соответствовать размеру геля. Перенос проводят при постоянном токе 100 мА в течение 1,5 часов при комнатной температуре.

II. Обработка мембраны

Для блокирования несвязавшихся с белками участков нитроцеллюлозы, мембрану после переноса инкубируют в 0,1 %-ном растворе Твин-20 в течение 10 минут при 37 °С, затем 30 мин в растворе 3 %-ного казеина или сухого молока.

Последующие стадии обработки фильтров включают:

- инкубацию с моноклональными антителами;
- с антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом;
- окрашивание мембраны.

Условия инкубации на каждой стадии: 1 час на шейкере при 37 °С. После окончания каждой стадии инкубации фильтр трижды отмывают проточной водой и трижды 0,1 %-ным раствором Твин-20 в течение 10 мин. Проявление зон осуществляют субстратным раствором пероксидазы (β-хлорнафтол, диаминобензидин). Реакцию окрашивания останавливают промыванием мембраны в воде.

После высушивания окрашенные реплики сканируют.

5.1.2.6. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Нуклеотидную последовательность ДНК определяют по методу Sanger. Реакцию проводят по протоколу фирмы «Promega» в 3 стадии:

1. Радиомаркирование (кинирование) праймера

Реакция кинирования праймера проходит в объеме 10 мкл в следующих условиях: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 10 мМ $MgCl_2$; 5 мМ DTT; 0,1 мМ спермидина; 10 pmol праймера; 10 pM [γ^{32}P]dATP; 5 ед. Т4-полинуклеотидкиназы. Инкубировать 30 минут на 37 °С, затем активность фермента T4-Kinase останавливают повышением температуры до 90 °С в течение 2 минут.

2. Синтез меченых цепей методом ПЦР

Кинированный праймер используется для синтеза методом ПЦР меченых ^{32}P цепей ДНК разной длины, терминированных случайным включением ddNTP. Реакция проводится в 17,5 мкл в условиях: 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 10 мМ $MgCl_2$; 1,5 pmol кинированного праймера; 40 fmol матричной ДНК; 5 ед. Taq-полимеразы. В заранее подготовленные 4 пробирки, содержащие ddNTP, 50 мМ NaCl, раскапывают по 4 мкл реакционной смеси, сверху наслаивают вазелиновое масло и проводят амплификацию. Реакция проходит в следующих условиях: плавление цепей – 95 °С – 0,5 мин; отжиг затравок – 42 °С – 0,5 мин; элонгация цепей ДНК – 70 °С – 1 минута. Продолжительность амплификации составляет 30 циклов. Останавливают реакцию добавлением 4 мкл буфера для нанесения (95 % формамид, 20мМ ЭДТА; 0,05 % бромфенолового синего и 0,05 % ксиленцианола FF).

3. Электрофорез

Полученные образцы прогревают 2 минуты при 70 °С и наносят на 6 % полиакриламидный денатурирующий гель. В каждый слот геля наносят по 3 мкл соответствующего образца. Электрофорез проводят при постоянном напряжении (25—30 V/cm) при температуре 55 °С. По окончании электрофореза проводят фиксирование геля в 10 %-ной уксусной кислоте, затем гель сушат 30 минут на стекле при температуре 60 °С. Экспонирование с рентгеновской пленкой «Кодак» проводят в течение 15—48 часов при комнатной температуре.

5.1.2.7. Рестрикционный анализ ампликонов

Рестрикционный анализ проводят с помощью гидролиза ДНК специфическими эндодезоксирибонуклеазами (рестриктазами) с последующим фракционированием в агарозном геле. Выбор рестриктаз определяется наличием специфических сайтов рестрикции в синтезированных ампликонов.

1. Гидролиз ДНК специфическими эндодезоксирибонуклеазами

Для гидролиза ДНК рестриктазами используют буферные смеси с низкой, средней и высокой ионной силой, согласно рекомендациям фирм-производителей этих ферментов. Время инкубации составляет от 1 до 4 часов при 37 °С.

2. Фракционирование фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле

Разделение фрагментов ДНК проводят методом электрофореза в горизонтальных агарозных гелях с концентрацией агарозы от 0,8 до 3 %. Электрофорез проводят при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере (0,04 М трис-ацетат pH 8,1, 0,002 М ЭДТА) с содержанием 0,5 мкг/мл бромистого этидия, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30—60 мин. Гели с разделенными фрагментами фотографируют в УФ-свете на пленку «Микрат-300» с использованием оранжевого светофильтра или осуществляют видеодетекцию полученной на трансиллюминаторе картины. Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере с разрешением не менее 600 точек на дюйм, должны быть приложены к протоколу проведения испытаний.

5.1.3. Методы оценки экспрессии целевого гена

Оценка экспрессии встроенного целевого гена осуществляется на двух уровнях. Первый уровень – транскрипционный. В этом случае определяется наличие в клетке ГММ иРНК, синтезируемой под контролем целевого гена. Второй уровень – трансляционный. В этом случае определяется наличие белкового продукта определенной молекулярной массы и/или определенной иммуноспецифичности.

Определение иРНК, транскрибируемых с целевого гена методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

1 мкг РНК, выделенной из клеток культуры ГММ, предварительно обработанной ДНКазой, отжигали с 10 пмоль одноцепочечного олигонуклеотида: 20 мин 65 °С и 10 мин при комнатной температуре. Затем проводили реакцию обратной транскрипции в общем объеме 20 мкл. Состав реакционной смеси: 1 мкг РНК с отожженным праймером; 50 мМ Трис-HCl pH 8,3; 50 мМ KCl; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ ДТТ; 1 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 0,5 мМ спермидина, 1 Ед AMV ревертазы. Реакцию проводили 30 мин при 42 °С. Далее эту смесь анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (методика проведения ПЦР описана в разделе 5.1.1).

Электрофорез белка, экспрессируемого целевым геном ГММ, в ПААГ в присутствии ДСН (PAGE-SDS)

Цель метода – определение молекулярного веса состава белка.

Для проведения анализа используют следующие оборудование и реактивы.

А. Электрофоретическая камера и источник питания.

Б. Реактивы:

1) раствор 40\0,8 (40 % акриламида, 0,8 % бис-акриламида);
2) раствор 20\0,3 (20 % акриламида, 0,3 % бис-акриламида);
3) буфер разделяющего геля (БРГ), pH 8,8 доводить концентрированной HCl (1,8 мл);
4) буфер фокусирующего геля (БФГ), pH 6,8 доводить концентрированной HCl (1 мл);

5) электродный буфер, pH 8,3 ДСН (SDS) – 4,0 г.;
6) раствор ДСН (SDS) 10 %;
7) раствор персульфата аммония 10 %;
8) раствор для окраски гелей ERZ Blue.

Проведение электрофореза

I. Приготовление гелевой пластинки:

- вымыть части прибора в детергенте;
- ополоснуть дистиллированной водой;
- смонтировать установку;
- внести разделяющий гель, полимеризация 30 мин;
- наслоить фокусирующий гель и вставить гребенку.

После полимеризации (10 мин) одномоментно удалить гребенку.

Гель можно хранить в полиэтилене, целлофане при температуре 4 °С; использовать в течение 4 дней.

II. Пробоподготовка

К образцу, содержащему ~1 мг\мл белка (по поглощению при 280 нм) добавить буфера образца с дитиотрейтолом, инкубировать при 100 °С 3 минуты.

III. Электрофорез:

- поместить гелевую пластину в камеру;
- заполнить камеры буфером;
- нанести образцы микрошприцем;
- включить источник питания;
- условия: ток – 20 мА на пластину;
- образцы концентрируются на анодном конце, затем разделяются по молекулярному весу на основе эффекта молекулярного сита.

IV. Окраска

По окончании электрофореза, гель вынуть из кассеты, поместить в камеру для окраски. Окраска согласно протоколу, прилагаемому к реагенту ERZ Blue.

V. Хранение

Для консервации применяют высушивание геля между целлофановыми пленками.

Для сохранения данного изображения гель фотографируют в видимом спектре или сканируют.

Иммуноблоттинг (Western-blotting Immunoassay)

Метод иммуноблотинга позволяет с помощью специфических моноклональных антител, определять идентичность синтезируемого белка продукту целевого гена, указанного заявителем.

После электрофоретического разделения в ПААГ-ДСН (PAGE-SDS) белки переносят из пластин геля на нитроцеллюлозную мембрану методом электропереноса в «полусухой» буферной системе.

Для этого на нижний угольный электрод (анод) ячейки для переноса помещают 6 листов фильтровальной бумаги (W№ 3), пропитанной раствором «С» (0,03 М Трис, 20 % изопропилового спирта, pH 10,0). Следующим слоем помещают нитроцеллюлозную мембрану ВА 85, затем накладывают пластину полиакриламидного геля с разделенными белками и 6 листов бумаги, пропитанной раствором «А» (0,025 М Трис, 0,04 М ε-аминокапроновой кислоты, 20 % изопропилового спирта, 0,01 % додецилсульфата лития, pH 9,4), накладывают верхний электрод (катод) и плотно прижимают.

При сборке системы следят, чтобы между слоями не было пузырьков воздуха. Размер листов фильтровальной бумаги и нитроцеллюлозных фильтров должен соответствовать размеру геля. Перенос проводят при постоянном токе 100 мА в течение 1,5 часов при комнатной температуре.

Обработка мембраны.

Для блокирования не связавшихся с белками участков нитроцеллюлозы, мембрану после переноса инкубируют в 0,1 % растворе Твин-20 в течение 10 минут при 37 °С, затем 30 мин в растворе 3 % казеина.

Последующие стадии обработки фильтров включают:

- инкубацию с моноклональными антителами (поликлональными антителами);
- с антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом;
- окрашивание мембраны.

Условия инкубации на каждой стадии: 1 час на шейкере при 37 °С. После окончания каждой стадии инкубации фильтр трижды отмывают проточной водой и трижды 0,1 % раствором Твин-20 в течении 10 мин. Проявление зон осуществляют субстратным раствором пероксидазы (β-хлорнафтол, диаминобензидин). Реакцию окрашивания останавливают промыванием мембраны в воде.

После высушивания окрашенные реплики сканируют.

5.2. Определение ДНК ГММ в готовых продуктах питания

Полная микробиологическая и молекулярно-генетическая, медико-биологическая и технологическая оценка ГММ проводится для пищевых продуктов 1 группы (см. п. 3.4 настоящих МУК). Такая оценка предусматривает наряду с анализом документации как исследования культур ГММ (таксономии и свойств доноров, реципиентов, самих ГММ, последовательностей генных вставок, наличия биомаркеров и т. д.), так и продуктов с ГММ.

Для продукции, относимой ко второй группе (само по себе длительное использование которой в питании населения без вреда для здоровья является одним из свидетельств безопасности), основными подходами могут быть микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка образцов готовых продуктов (идентификация ДНК генной вставки, наличие селективных маркеров или маркеров генной модификации [векторных генов, линкеров и т. п.; либо комплексная фено- и генотипическая идентификация выделенного из продукта ГММ*] и/или экспертиза документации.

Стандартно принятыми методами для определения наличия чужеродного генетического материала в продуктах являются иммунологический анализ и выявление ДНК ГММ при помощи ПЦР.

Критерием в пользу выбора ПЦР как метода анализа является высокая чувствительность метода, превосходящая как минимум на два порядка чувствительность известных иммунологических методов. Помимо этого, ПЦР является гораздо менее дорогим и более стабильным методом, чем другие методы анализа. Немаловажным досто-

* При экспертизе продуктов, содержащих жизнеспособные ГММ.

инством ПЦР является то, что используемые в реакции синтетические олигонуклеотиды при правильном их выборе могут быть применены для проведения анализов различных ГММ, что в случае иммунологических методов невозможно.

5.2.1. ПЦР-идентификация ДНК ГММ в готовых продуктах питания

5.2.1.1. Выделение ДНК ГММ из тестируемого продукта

В выборе метода выделения ДНК определяющую роль играет содержание жиров в продуктах питания. При повышенном содержании жиров проводится дополнительная экстракция суспензией неполярных растворителей с водой. Это позволяет перевести содержащуюся в пищевом продукте ДНК в водную фазу, в которой и производится дальнейшая очистка.

Обычная длина ПЦР фрагмента при выявлении ДНК ГММ не превышает 1 000 пар оснований, поэтому в основу нижеследующих методик легли процедуры выделения и очистки, позволяющие получить достаточно чистые препараты ДНК для проведения ПЦР. Вторым критерием отбора методик явилось требование минимизации времени, затрачиваемого на выделение одного препарата ДНК.

1. 0,5 г образца пищевого продукта гомогенизируют при помощи тефлонового пестика в 0,5 мл буфера А (100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 10 мМ β-меркаптоэтанола.

2. После гомогенизации добавляют 100 мкл 20 % SDS. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют 20—30 мин при 65 °С.

3. Охлаждают до 4 °С, добавляют 0,3 мл 5 М ацетата калия, перемешивают в вортексе и центрифугируют 10 мин при 15 000 об./мин при комнатной температуре.

4. К надосадку добавляют 1 мл смолы Wizard MaxiPreps и инкубируют смесь 10 мин при 25 °С.

5. Затем фильтруют полученную смесь сквозь мини-колонку, промывают 2 мл 80 %-ного изопропанола, центрифугируют (15 000 об./мин, 2 мин) и удаляют оставшийся в мини-колонке изопропанол .

6. Добавляют в мини-колонку 50 мкл дистиллированной воды, подогретой 65 °С.

7. Инкубируют мини-колонку с водой 10 мин при 65 °С, центрифугируют (15 000 об./мин, 2 мин) и переносят раствор ДНК в чистую стерильную пробирку.

В зависимости от содержания ДНК в конкретном пищевом продукте на проведение единичной полимеразно-цепной реакции в объеме 50 мкл требуется от 2 до 20 мкл полученного препарата ДНК.

Образцы пищевых продуктов с повышенным содержанием масла перед выделением ДНК требуется подвергнуть дополнительной экстракции эмульсией хлороформа в воде.

Для этого 0,5 г исследуемого продукта гомогенизируют в смеси 0,5 мл буфера А и 0,5 мл хлороформа и инкубируют гомогенат 20 мин при 56 °С. Затем охлаждают его до 4 °С и центрифугируют 10 мин при 15 000 об./мин на микроцентрифуге при комнатной температуре. Водную фазу собирают и переносят в чистую пробирку. Далее продолжают, начиная с пункта 2 вышеизложенной методики.

5.2.1.2. Выбор праймеров для проведения ПЦР

Для точного определения наличия ДНК вставки в штаммах ГММ фирмой-заявителем должна быть представлена информация о нуклеотидной последовательно-

сти целевого гена и его регуляторных элементов, а также о структурных элементах и маркерах вектора.

Это требование вводится для того, чтобы можно было точно идентифицировать наличие конкретной генетической конструкции. В таком случае синтетические олигонуклеотиды для проведения ПЦР будут синтезированы таким образом, чтобы выявить факт наличия генетических модификаций. Длина используемых при анализе специфических праймеров должна составлять не менее 20 пар нуклеотидов с целью избежания появления в результате ПЦР неспецифических продуктов реакции.

В случае, когда подобная информация по каким-то причинам не может быть представлена (например, фирма-изготовитель продуктов питания закупает используемые в технологическом процессе штаммы микроорганизмов у специализированного производителя) необходимо проводить проверку на присутствие в выделяемой из тестируемой продукции ДНК наборами праймеров, позволяющими подтвердить видовую идентификацию штамма и выявить наличие возможных генетических модификаций. Рекомендуемые стратегии выявления генетических модификаций предлагают использовать для этих целей наиболее часто употребляемые векторные последовательности: селективные гены (гены антибиотико-резистентности, бактериоцинов или ауксотрофные селективные маркеры), неэкспрессируемые последовательности (полилинкеры, промоторы или терминаторы), а также последовательности мигрирующих элементов. Обнаружение таких последовательностей будет свидетельствовать о возможных незадокументированных генетических модификациях, что потребует проведения дополнительных исследований, подтверждающих или опровергающих это предположение.

5.2.1.3. Выбор условий проведения ПЦР

Для ПЦР-анализа ДНК, выделенной из продуктов питания, подбираются оптимальные условия проведения реакции для каждой конкретной пары праймеров, обеспечивающие максимальную чувствительность и специфичность анализа, исключающую наличие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК.

Выбор условий проведения ПЦР включает подбор оптимального соотношения компонентов реакционной смеси, структуры программы амплификации (временных и температурных характеристик каждого этапа амплификации) и адекватного метода детекции результатов.

5.2.1.4. Проведения ПЦР

Для проведения ПЦР используется термостабильная Taq-полимераза, соответствующий ей десятикратный ПЦР-буфер, растворы четырех дезоксирибонуклеотитрифосфатов и выбранной пары праймеров. В типичных экспериментах реакционную смесь объемом 50 мкл составляют так, чтобы она содержала 350 нг геномной ДНК, 1,5 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1 ед. Taq-полимеразы. Затем к реакционной смеси добавляют 30 пкМ пары олигонуклеотидных праймеров в буферном растворе следующего состава: 67 мМ Трис-HCl буфер (pH 8,0 при 25 °C), содержащий 16,6 мМ сульфат аммония, 67 мМ MgCl, 10 мМ 2-меркапто-этанол, 6,7 мкМ ЭДТА и бычий сывороточный альбумин в концентрации 170 мкг/мл. Далее на каждую пробу наслаивают по 50 мкл минерального масла и реакцию проводят по специально подобранным программам в многоканальном амплификаторе ДНК.

При необходимости возможно проведение мультиплексной ПЦР для анализа нескольких важных фрагментов вставки, а также второго раунда ПЦР с внутренней парой праймеров (nested PCR) для повышения специфичности реакции.

Продукты амплификации анализируют с помощью электрофореза в пластине 6 %-ного полиакриламидного геля (2,5 ч при 200 в). ДНК-маркерами служит стандартный набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322, полученный под действием рестриктазы Alu 1. Окрашивание фрагментов ДНК осуществляется этидиум бромидом. Анализ результатов и фотографирование электрофореграммы осуществляют в условиях ультрафиолетовой подсветки на трансиллюминаторе. Допустимо анализ продуктов ПЦР производить путем электрофореза в 2 %-ном агарозном геле с последующей видео- или фотодетекцией, полученной на трансиллюминаторе картины. Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере с разрешением не менее 600 точек на дюйм, должны быть приложены к протоколу проведения испытаний.

Приложение

Термины и определения

Пищевые продукты – продукты в натуральном или переработанном виде, употребляемые человеком в пищу (в т. ч. продукты детского питания, продукты диетического питания), бутылированная питьевая вода, алкогольная продукция (в т. ч. пиво), безалкогольные напитки, жевательная резинка, а также продовольственное сырье, пищевые добавки и биологически активные добавки.

Продовольственное сырье – сырье растительного, животного, микробиологического, минерального и искусственного происхождения и вода, используемые для изготовления пищевых продуктов.

Качество пищевых продуктов – совокупность характеристик пищевых продуктов, способных удовлетворять потребности человека в пище при обычных условиях их использования.

Безопасность пищевых продуктов – состояние обоснованной уверенности в том, что пищевые продукты при обычных условиях их использования не являются вредными и не представляют опасности для здоровья нынешнего и будущих поколений.

Удостоверение качества и безопасности пищевых продуктов – документ, в котором изготовитель удостоверяет соответствие качества и безопасности каждой партии пищевых продуктов требованиям нормативных, технических документов.

Нормативные документы – государственные стандарты, санитарные и ветеринарные правила и нормы, устанавливающие требования к качеству и безопасности пищевых продуктов, контролю за их качеством и безопасностью, условиям их изготовления, хранения, перевозок, реализации и использования, утилизации или уничтожения некачественных, опасных пищевых продуктов, материалов и изделий.

Технические документы – документы, в соответствии с которыми осуществляются изготовление, хранение, перевозка и реализация пищевых продуктов, материалов и изделий (технические условия, технологические инструкции, рецептуры и др.).

Генная инженерия – совокупность методов и технологий, в т. ч. технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

Генно-инженерная деятельность – деятельность, осуществляемая с использованием методов генной инженерии и генно-инженерно-модифицированных (генно-модифицированных) организмов.

Генетически модифицированный организм (ГМО) – организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в т. ч. гены, их фрагменты, или комбинацию генов.

Генетически модифицированный микроорганизм (ГММ) – микроорганизмы (бактерии, дрожжи и др.), в которых генетический материал (дезоксирибонуклеиновая кислота) изменен с использованием методов генной инженерии.

Библиографические данные

1. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов Под ред. И. М. Скурихина и В. А. Тутельяна —М.: «Брандес – Медицина», 1998.

2. ФАО/ВОЗ Стратегии оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с помощью биотехнологии //Материалы объединенного совещания ФАО/ВОЗ по оценке биотехнологических методов производства и переработки пищевых продуктов с точки зрения их безопасности. Женева. Швейцария, 1990.

3. FAO/WHO Protein quality evaluation, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation Held in Bethesda, Md, USA, 4—8 December, 1989, FAO Rome.

4. FAO/WHO Biotechnology and food safety, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1996. UN Food and Agriculture Organization, Rome.

5. ILSI Safety assassment of viable genetically modified microorganisms used in food, ILSI Europe Workshop on the Safety Assessment of Viable GMM, Microbial ecology in health and desiase, 1999, 11: 198—207.

6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Из-во «Мир», 1984.

7. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот: Наука, 1985.

8. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 //Nature, 1970.—V. 227.—P. 680—685.

9. Blum H., Beir H., Cross H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels //Electrophoresis, 1987.—V. 8.—P. 126—129.

10. Ohnashi T. et al. Preparative hight-yield electroelution of proteins offer separation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and its application to analysis of aminoacid sequences and to riseantibodyes //J.Chromatogr., 1991.—V. 585.—P. 153—159.

11. Towbin H., Staehelin T., Gordon J., Jordan J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: prosedure and some applications //Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979.—V. 79.—P. 4350—4354.

12. Bredford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograme quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding //Anal. Biochem., 1976.—V. 72.

13. MacCormick C. A., Griffin H. G., Underwood H. M., Gasson M. J. Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food //J. Appl Microbiol, 1998, 84, 969—980.

14. Gasson M. Genetic manipulation of dairy cultures //Bulletin of the IDF 1997, 320: 41—44.

15. Koning W. N. et al Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium //Curr. Opin. Microbiol., 200, 3(3):276—282.

16. Pridmore R. D. et al Genomics, molecular genetics and the food industry //J. Biotechnol., 2000, 78, 3, 251—258.

17. Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J. Foreign gene expression in yeast: a review //Yeast, 1992, 8, 423—488.

18. McKay L. L. Update. on dairy starter cultures: genetics and biotechnology of dairy streptococci. In: Proceedings of the ILSI International seminar on biotechnology, Tokyo, 1988.

19. Lindemann J. Biotechnology in food: a summary of major issues regarding safety assurance //Regular Toxilogy and Farmacology, 1990, 12: 96—104.

20. Holst-Jensen A., Sissel B. R., Lovseth A., Berdal K. G. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) //Ann. Bioannal. Chem., 2003, 375: 985—993.

21. Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства. Утв. МЗ СССР 29.06.84 № 3049/84.—М., 1985.

22. AOAC Official methods of analysis, AOAC International, 1996.—V. 2, chapter 33, 45, 48.

23. Теоретические и клинические аспекты науки о питании /Под ред. Волгарева М. Н.—Т. 8, 1987.—210 с.

24. Госфармакопея СССР ГФ.—Т. 2, 1990.

25. Трахтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте.—М.: Медицина, 1978.

26. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.

27. Тиц Н. Энциклопедия клинических лабораторных тестов.—М.: Лабинформ, 1997.

28. Транхтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Показатели нормы у лабораторных животных.—М.: Медицина, 1978.

29. Фонштейн Л. М., Абилев С. К., Бобринев Е. Ф. и др. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: Методические указания.—М., 1985.—34 с.

30. Kaufman P. B., Wu W., Kim D., Cseke L. J. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine: CRC Press, 1995.

31. Гринберг К. Н., Кухаренко В. И., Ляшко В. Н., Терехов С. М., Пичугина Е. М., Фрейдин М. И., Черников В. Г. /В кн.: Методы культивирования клеток.—Л.: Изд-во «Наука», 1988.—С. 250—257.

1.3. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.1794—03

1. Разработаны: Департаментом госсанэпиднадзора Минздрава России (М. П. Шевырева, Ю. М. Федоров); Центром по генной диагностике особо опасных инфекционных заболеваний Минздрава России на базе Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (В. В. Кутырев, А. Н. Куличенко, Н. А. Осина, И. Н. Шарова, М. Н. Ляпин, И. Г. Дроздов); Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Е. Н. Беляев, И. В. Брагина, А. А. Ясинский, Э. Ф. Опочинский, Т. В. Воронцова, М. В. Зароченцев); ЦНИИ эпидемиологии Минздрава России (В. И. Покровский, Н. А. Семина, Г. А. Шипулин, Е. Н. Родионова); Противочумным центром Минздрава России (В. Е. Безсмертный, С. М. Иванова, Ю. А. Панин); ГИСК им. Л. А. Тарасевича (Т. А. Бектимиров, Р. А. Волкова, М. С. Воробьева, Л. В. Саяпина); Ростовским-на-Дону научно-исследовательским противочумным институтом (И. Ю. Сучков, С. О. Водопьянов, Б. Н. Мишанькин); Ставропольским научно-исследовательским противочумным институтом (Е. И. Еременко, А. Ф. Брюханов, О. И. Цыганова); Иркутским научно-исследовательским противочумным институтом (С. В. Балахонов, М. Ю. Шестопалов); ГНЦ биотехнологии и вирусологии «Вектор» (Г. М. Игнатьев, Н. Л. Максимов, А. А. Неверов, В. А. Терновой, С. В. Нетесов); Биоком (А. Б. Комаров).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Министерстве здравоохранения Российской Федерации (протокол № 20 от 2 декабря 2003 г.).

3. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 5 декабря 2003 г.

4. Введены впервые.

Содержание

1. Область применения 94
2. Нормативные ссылки 94
3. Общие положения 95
4. Требования к организации работ 96
5. Требования к помещению и оборудованию ПЦР-лабораторий 96
6. Требования к проведению работ 99
7. Требования к защитной одежде 100
8. Требования к обработке помещений и обеззараживанию материала 100
9. Проведение внутрилабораторного контроля 101

Приложение 1. Принципиальная схема размещения ПЦР-лаборатории 102

Приложение 2. Примерное размещение оборудования в рабочих зонах ПЦР-лаборатории 104

Приложение 3. Использование средств индивидуальной защиты в рабочих зонах ПЦР-лаборатории 106

Приложение 4. Обеззараживание исследуемого материала 109

Приложение 5. Режимы дезактивации при постановке ПЦР 110

Приложение 6 Действия при контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами 112

Приложение 7. Взятие материала на исследование 113

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
5 декабря 2003 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.3. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.1794—03

1. Область применения

1.1. Методические указания предназначены для органов и учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы, а также могут быть использованы юридическими лицами, независимо от организационно-правовых форм и форм собственности, и индивидуальными предпринимателями, выполняющими в установленном порядке работы с объектами и материалами, содержащими или подозрительными на содержание микроорганизмов I—II групп патогенности:

- диагностические (исследование объектов окружающей среды и клинического материала, в том числе от больных с подозрением на ТОРС);
- экспериментальные;
- производственные (работы по производству и контролю генодиагностических препаратов при условии соблюдения требований GMP).

1.2. Методические указания определяют принципы организации лабораторий и этапы выполнения ПЦР-анализа: взятие проб, первичная обработка, хранение, условия транспортирования, обеззараживание материала, выделение нуклеиновых кислот, проведение ПЦР (ОТ-ПЦР), учет и регистрация результатов при исследовании биологического материала, пищевых продуктов, материала из объектов окружающей среды.

1.3. Методические указания регламентируют выполнение исследований с использованием ПЦР-анализа, осуществляемого сертифицированными тест-системами и оборудованием и предусматривающего учет результатов методом электрофореза или гибридизационно-ферментного анализа (ГиФА).

2. Нормативные ссылки

2.1. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.1285—03.

2.2. Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I—IV групп патогенности (опасности), генно-

инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами» СП 1.2.1318—03.

2.3. Санитарные правила и нормы «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» СанПиН 2.1.7.728—99.

2.4. Методические указания «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР» МУ 3.5.5.1034—01.

2.5. «Методические указания по детекции патогенной микрофлоры в клиническом материале, пищевых продуктах, объектах внешней среды и генетической идентификации клеток с помощью полимеразной цепной реакции». Госкомсанэпиднадзор России от 18.10.96 № 01—19/123—17.

2.6. Методические указания «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды». МЗ СССР от 01.09.86 и Госагропром СССР от 01.09.86.

2.7. Методические указания «Лабораторная диагностика холеры» МУ 4.2.1097—02.

2.8. Методические указания «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза у людей» МУ 3.1.7.1189—03.

2.9. Методические указания «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций» МУ 3.1.1027—01.

2.10. «Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции». М., 1995.

2.11. Временные методические рекомендации «Лабораторная диагностика «атипичной пневмонии» (SARS) методом ПЦР», утв. Минздравом России 03.05.03.

2.12. Руководство по профилактике чумы. Саратов: Слово, 1992.

2.13. Руководство «Использование ультрафиолетового излучения для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях». Р 3.1.683—98, МЗ РФ.

2.14. Инструкция по проектированию санитарно-эпидемиологических станций СН 535—81. М.: Стройиздат, 1982.

3. Общие положения

3.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) основана на амплификации (многократном увеличении числа копий) фрагмента ДНК-мишени в условиях in vitro и позволяет обнаружить специфичный участок генома микроорганизма.

3.2. Аналитическая чувствительность тест-систем для выявления ДНК (РНК) микроорганизмов методом ПЦР составляет 1 х 10^2—1 х 10^4 м.к. (геномных эквивалентов)/мл, специфичность – 85—100 %, возможно исследование любого биологического материала и объектов окружающей среды, время выполнения анализа 4—8 ч.

3.3. Для выявления ДНК (РНК) микроорганизмов I—II групп патогенности ПЦР-анализ используют:

- в качестве экспрессного метода при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание) и индикации патогенных биологических агентов (ПБА) в объектах окружающей среды;
- как ускоренный предварительный тест при выполнении культурального и биологического методов исследования и для идентификации подозрительных культур;
- для определения эпидемиологической значимости изолятов на основании выявления генетических маркеров вирулентности, например, ctxA- и tcpA-генов у возбудителя холеры;

- эпидемиологического мониторинга;
- в научных целях для генотипирования штаммов или их ретроспективного анализа.

4. Требования к организации работ

4.1. Проведение исследований по выявлению ДНК (РНК) микроорганизмов I—II групп патогенности сопряжено с необходимостью одновременного обеспечения правил биологической безопасности работ и требований к организации и проведению ПЦР-анализа с целью предотвращения контаминации исследуемых проб нуклеиновыми кислотами (НК).

4.2. Противоэпидемический режим работы при ее организации и выполнении должен быть обеспечен в соответствии с СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», регламентирующими работу с микроорганизмами I—II групп патогенности.

4.3. Все этапы исследования материала, зараженного или подозрительного на зараженность вирусами I группы, проводят в условиях максимально изолированных лабораторий с использованием изолирующих средств индивидуальной защиты или в боксах биологической безопасности III класса в защитном костюме IV типа, дополненном резиновыми перчатками.

4.4. Исследования материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности, методом ПЦР проводят в организациях, имеющих лицензию на деятельность, связанную с возбудителями инфекционных заболеваний человека, в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения соответствующих работ (с указанием конкретных видов микроорганизмов). В этой же лаборатории могут проводиться ПЦР-исследования с микроорганизмами III—IV групп патогенности.

4.5. Допускается проведение исследований крови методом ПЦР на бруцеллез, парентеральные вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекцию в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III группы патогенности, выданное в установленном порядке.

4.6. Передачу исследуемого материала в другие организации проводят в соответствии с п.п. 2.1.2 и 2.8.20 СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

4.7. Работу по ПЦР-диагностике организует специалист с высшим образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации (повышения квалификации) по работе с ПБА I—II групп патогенности и по ПЦР-диагностике.

5. Требования к помещению и оборудованию ПЦР-лабораторий

5.1. Помещения, в которых проводят исследования на наличие НК микроорганизмов I—II групп патогенности, размещают в «заразной» зоне лаборатории, проводящей диагностические и другие исследования с указанными микроорганизмами. При наличии возможности помещения располагают в виде отдельного блока. При строительстве новых или реконструкции имеющихся помещений лабораторию ПЦР размещают в отдельно стоящем здании (изолированной части здании) с соблюдением требований СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)» и учетом особенностей устройства вентиляционной системы ПЦР-лаборатории, изложенных в п. 5.19 настоящих методических указаний.

5.2. Рабочая зона ПЦР-лаборатории в соответствии с этапами ПЦР-анализа должна включать следующий минимальный набор последовательно расположенных самостоятельных помещений (прилож. 1) или отдельно выделенных рабочих зон (в составе других функциональных помещений):

- приема, разборки, первичной обработки материала;
- подготовки проб, выделения нуклеиновых кислот (НК);
- приготовления реакционных смесей, проведения ПЦР и обратной транскрипции (ОТ);
- учета результатов методом электрофореза или ГиФА.

5.3. Комнату выделения НК располагают вблизи от комнаты приема материала, а помещение для учета результатов – по возможности в отдалении от других перечисленных помещений для обеспечения условий, исключающих занос в них продуктов амплификации (ампликонов) с воздушным потоком.

5.4. Не допускается выполнение ПЦР-исследований в помещениях для проведения работ с использованием культуральных (накопление патогенных биологических агентов) и генно-инженерных методов, в том числе связанных с получением (клонированием) и выделением рекомбинантных плазмид.

5.5. Зону приема, регистрации, сортировки, первичной обработки материала (объединение или разделение проб, центрифугирование, инактивацию и т. д.) располагают в комнате приема материала блока для работы с инфицированными животными или в отдельной боксированной комнате. В этих же помещениях может проводиться обработка проб к другим видам исследований (бактериологическое, вирусологическое, серологическое и т. д.). При наличии возможности в помещении устанавливают бокс биологической безопасности III класса защиты (допускается также использование бокса 2 ШНЖ, например, фирмы «Изотоп» и др.) или бокс безопасности II класса защиты.

5.6. Зону по подготовке проб и выделению нуклеиновых кислот размещают в боксированном помещении (микробиологический бокс с предбоксом) или в комнате заражения и вскрытия животных. Работу проводят в боксе биологической безопасности II или III класса. В рабочей зоне располагают оборудование и предметы, необходимые только для предварительной обработки, выделения НК (примерный перечень представлен в прилож. 2).

5.7. Зону приготовления реакционных смесей и проведения ОТ и ПЦР-амплификации располагают в боксированном помещении или боксе биологической безопасности II класса (или ПЦР-боксе) – для подготовки реакционных смесей для ОТ и ПЦР.

5.8. Работу по подготовке реакционных смесей для ПЦР и ОТ-ПЦР проводят до доставки в бокс проб, поступающих из зоны выделения НК. Смесь может быть приготовлена также за пределами помещений лаборатории, предназначенных для работы с заразным материалом, например, в комнате (боксе) для розлива питательных сред.

5.9. При необходимости этап подготовки проб и выделения нуклеиновых кислот может выполняться в одной комнате с этапом ПЦР при наличии в ней бокса биологической безопасности II или III класса защиты для выделения НК и бокса биологической безопасности II класса (или ПЦР-бокса) – для подготовки реакционных смесей для ОТ и ПЦР. Каждый бокс рассматривается как соответствующая рабочая зона.

5.10. Зону детекции результатов располагают в боксированном помещении. При отсутствии боксированного помещения работу проводят в отдельной комнате, при возможности в ПЦР-боксе.

5.11. При одновременном использовании двух методов детекции продуктов амплификации – электрофоретического и ГиФА – следует выделить отдельные помещения или две рабочие зоны. Оборудование и принадлежности для каждого вида анализа мар-

кируют применительно к каждой зоне. Обмен посудой и пипетками между зонами не допускается.

5.12. Помещения ПЦР-лаборатории покрывают кафелем (пол, стены) или масляной краской (стены, потолок), устойчивой к действию моющих и дезинфицирующих средств.

5.13. Во всех помещениях устанавливают бактерицидные лампы. Рекомендуется дополнительная установка переносного ультрафиолетового бактерицидного облучателя-рециркулятора.

5.14. Окна должны быть плотно закрыты. Для защиты рабочих столов от попадания прямого солнечного света используют светозащитные пленки из материала, устойчивого к дезинфицирующим средствам. Использование жалюзи не рекомендуется из-за адсорбции пыли.

5.15. Каждая рабочая зона должна иметь свой набор мебели, лабораторного оборудования, реагентов, автоматических пипеток, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, защитной одежды, обуви, резиновых перчаток, уборочного инвентаря и пр., используемых только в данной комнате (рабочей зоне).

5.16. Имущество каждой рабочей зоны должно иметь маркировку указанной зоны. Применение его в других помещениях или для других видов исследований не допускается.

5.17. В рабочих зонах должен быть свой набор холодильников (прилож. 2):

- в комнате приема материала от 4 до 8 °С, минус 20 °С и минус 70 °С (при необходимости длительного хранения материала);
- в комнате выделения нуклеиновых кислот от 4 до 8 °С и минус 20 °С для хранения набора выделения НК; от 4 до 8 °С – для хранения препаратов НК; не допускается хранение проб материала или препаратов НК в одном холодильнике с компонентами набора для выделения НК;
- в комнате ПЦР-амплификации от 4 до 8 °С и минус 20 °С – для хранения наборов обратной транскрипции и амплификации НК;
- в комнате детекции продуктов амплификации от 4 до 8 °С – для хранения наборов электрофоретической детекции и ГиФА.

5.18. Помещения ПЦР-лаборатории оборудуют приточно-вытяжной или вытяжной вентиляцией, соответствующей требованиям п.п. 2.3.16 и 2.4.3 СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

5.19. При выполнении ПЦР воздухообмен внутри и между помещениями может повышать опасность контаминации проб из-за вероятности проникновения молекул НК и продуктов амплификации через фильтры. Снижение этой опасности достигается указанной ниже системой вентиляции лаборатории:

- следует полностью исключить воздухообмен между помещением для детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение) и остальными комнатами ПЦР-лаборатории, а также другими помещениями организации (давление воздуха в пост-ПЦР-помещении должно быть ниже, чем в указанных помещениях);
- при смежном расположении комнаты приема материала и комнаты выделения нуклеиновых кислот давление в последней должно быть не ниже, чем в комнате приема материала;
- если обе названные комнаты, входящие в пре-ПЦР-помещение, имеют смежное расположение с помещением для проведения ПЦР, давление воздуха в них должно быть ниже, чем в ПЦР-помещении; при отдаленном размещении ПЦР-помещения давление воздуха в нем должно быть не ниже, чем в пре-ПЦР-помещении.

5.20. Разница в давлении воздуха в помещениях ПЦР-лаборатории создается за счет различий в кратности воздухообмена в них. Расчеты кратности воздухообмена с учетом требований проведения ПЦР-анализа и требований «Инструкции по проектированию санитарно-эпидемиологических станций» СН 535—81 (М.: Стройиздат, 1982) приведены в таблице:

Наименование помещения	Кратность воздухообмена ($м^3/ч$)	
	приток	вытяжка
Зона приема и первичной обработки материала	5	6
Зона подготовки проб и выделения нуклеиновых кислот	5	6
Зона приготовления реакционных смесей, проведения ПЦР и ОТ-ПЦР	5	5
Зона учета результатов методом электрофореза или ГиФА	5	7

5.21. При отсутствии системы вентиляции, указанной в п.п. 5.18—5.19, уменьшение вероятности контаминации проб достигается мерами по ограничению воздухообмена между помещениями ПЦР-лаборатории.

5.22. При необходимости в ПЦР-лаборатории могут быть установлены кондиционеры в соответствии с п. 2.4.5 СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

6. Требования к проведению работ

6.1. Взятие материала производят согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований для каждого вида возбудителя инфекций (прилож. 3), инструкциям к тест-системам и в соответствии с СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

6.2. Транспортирование исследуемого материала и промежуточных продуктов ПЦР-анализа из одного помещения в другое при невозможности передачи их в смежные комнаты через шлюзовые передаточные окна, осуществляют в плотно закрывающихся контейнерах, обрабатываемых дезинфицирующими средствами после каждого переноса проб.

6.3. Доставку проб для исследования, а также их хранение осуществляют в закрывающихся металлических или пластмассовых контейнерах, на дне которых размещают адсорбирующий материал (марлевая салфетка, ткань, вата и пр.), смоченный раствором дезинфицирующего средства. Контейнер помещают в сумку-холодильник или в контейнер с хладагентами.

6.4. Манипуляции, сопровождающиеся риском образования аэрозоля (встряхивание, центрифугирование и т. д.) при обработке материала и выделении нуклеиновых кислот выполняют в боксах биологической безопасности II или III класса.

6.5. Приборы, оборудование и средства измерения должны быть аттестованы (поверены), технически исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации.

6.6. Наконечники должны строго соответствовать автоматическим пипеткам, пробирки для амплификации – термоциклерам (в соответствии с инструкцией фирмы-

производителя прибора). Обязательной является смена наконечников для автоматических пипеток после завершения каждой манипуляции.

7. Требования к защитной одежде

7.1. Выбор типа защитного костюма проводится в строгом соответствии с СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)» и определяется видом возбудителя, рабочей зоной ПЦР, оснащением ее боксами биологической безопасности (прилож. 3).

7.2. Прием и первичную обработку материала, доставленного на исследование (объединение или разделение проб, центрифугирование, инактивацию и т. д.), выполняют в защитном костюме I—II или IV типа, дополненном перчатками и, при необходимости, респиратором.

7.3. В помещении подготовки проб и выделения НК при исследовании материала, инфицированного бактериями I—II групп, подвергнутыми инактивации на этапе подготовки проб, работу проводят в боксе биологической безопасности II класса в костюме IV типа, дополненном резиновыми перчатками.

7.4. В связи с отсутствием регламентированных методов инактивации вирусов II группы работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями КГЛ, ТОРС, ГЛПС, ОГЛ, проводят в боксе биологической безопасности III класса защиты в костюме IV типа и резиновых перчатках или в боксе биологической безопасности II класса в костюме I типа. Работу с другими вирусами II группы проводят в боксе биологической безопасности II класса в защитном костюме IV типа, дополненном резиновыми перчатками и респиратором.

7.5. На этапах проведения ПЦР, учета результатов работу проводят в следующих видах защитной одежды:

- с обеззараженным материалом – в костюме IV типа, дополненном резиновыми перчатками;
- с пробами, инфицированными возбудителями КГЛ, ТОРС, ГЛПС, ОГЛ – в костюме I типа или в боксе биологической безопасности II класса в костюме IV типа, дополненного резиновыми перчатками и респиратором. Работу с другими вирусами II группы проводят в защитном костюме IV типа, дополненном респиратором и резиновыми перчатками.

7.6. В пост-ПЦР-помещении должны работать сотрудники, не занятые на этапах подготовки проб и постановки ПЦР, при входе в помещение надевают бахилы или сменную обувь.

7.7. Надевание и снятие защитной одежды производят в предбоксах. В каждом из них должен быть отдельный комплект защитной одежды и обуви.

7.8. Наиболее загрязненной продуктами амплификации считается защитная одежда зоны детекции и, в первую очередь, резиновые перчатки. Перед снятием одежды необходимо заменить перчатки на чистые.

7.9. Обработку одежды из комнат подготовки проб, ПЦР-амплификации и учета результатов проводят раздельно.

8. Требования к обработке помещений и обеззараживанию материала

8.1. Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)». В комнатах, в которых проводят работу с выделенными НК, рабочие по-

верхности, штативы, оборудование следует обеззараживать ежедневно ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч до начала работы и после нее, полы подвергать ежедневной влажной уборке дезинфицирующими средствами, регламентированными указанными санитарными правилами или 0,2 %-ным раствором ДП-2Т, обладающим также способностью инактивировать ампликоны. Перед началом работы рабочую поверхность столов дополнительно обрабатывают 70 %-ным этиловым спиртом. Ежемесячно проводят профилактическую обработку рабочей поверхности столов, оборудования, штативов 0,2 %-ным раствором ДП-2Т.

8.2. Дважды в год (при необходимости чаще) осуществляют обработку автоматических дозаторов. Дозаторы разбирают, обрабатывают моющим раствором для удаления жирового загрязнения, после чего остатки моющего средства удаляются ветошью, смоченной водой. Затем проводят обработку 1 N соляной кислотой; время экспозиции – 1 ч. Остатки раствора тщательно удаляют ветошью, смоченной водой, и проводят обеззараживание влажных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч. По окончании обработки дозаторы собирают и проводят калибровку в соответствии с прилагаемой инструкцией по пользованию дозаторами. Автоклавируемые дозаторы обеззараживают паром под давлением 2,0 кГс/см^2 (0,2 МПа) – при температуре 132 ± 2 °С, в течение 60 мин.

8.3. Обеззараживание проб проводят в соответствии с МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР». Порядок обеззараживания проб и режимы дезактивации при постановке ПЦР представлены в прилож. 4 и 5.

8.4. При возникновении контаминации (получении повторных положительных результатов в отрицательных контролях, а также при тестировании контрольных смывов) в помещениях проводят мероприятия по ликвидации контаминации. Объем мероприятий зависит от масштаба контаминации, определяемого результатами исследования смывов (прилож. 6).

Проведение ПЦР-исследований до завершения деконтаминационных мероприятий не допускается.

9. Проведение внутрилабораторного контроля

9.1. Внутрилабораторный контроль проводят с периодичностью, зависящей от объема выполняемой работы. Периодичность определяется руководителем лаборатории.

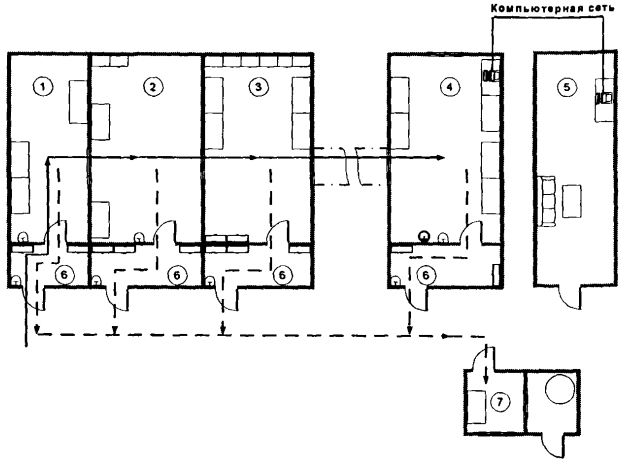
9.2. Контроль осуществляют путем исследования шифрованных «положительных» и «отрицательных» проб. В качестве «положительных» могут использоваться образцы, искусственно контаминированные НК, или уже ранее исследованные пробы, хранившиеся не более 1 недели при температуре минус 20 °С. В этих пробах определяют НК тех же возбудителей, что и при первичном исследовании. В качестве «отрицательных» применяют образцы, не содержащие НК возбудителей инфекционных заболеваний, например, транспортная среда, ДНК-буфер.

9.3. Количество проб должно быть достаточным для оценки работы сотрудников и выявления контаминированных участков лаборатории.

9.4. Для выявления возможной контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами контроль проводят путем взятия смывов с поверхностей (прилож. 6).

Приложение 1

Принципиальная схема размещения ПЦР-лаборатории



Обозначения:

1 – зона приема, разбора и первичной обработки материала;
2 – зона подготовки проб и выделения НК;
3 – зона приготовления реакционных смесей, проведения ОТ и ПЦР;
4 – зона детекции результатов методом электрофореза и ГиФА;
5 – комната анализа результатов;
6 – предбокс;
7 – комната обеззараживания материала;

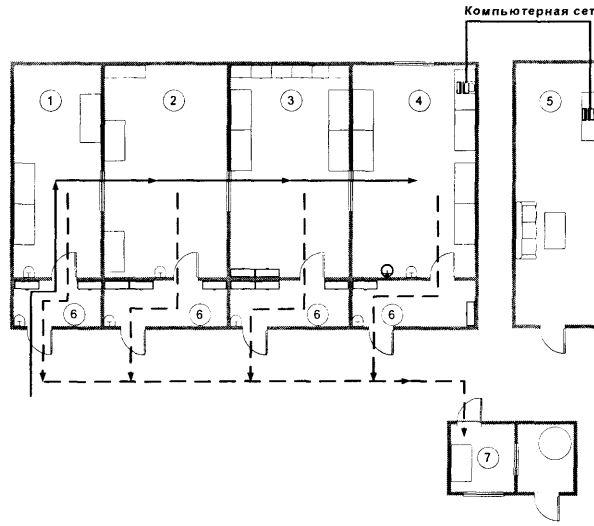
– раковина; – автоклав, – окно, шлюз;

– устройство для слива воды после влажной уборки помещения;

– шкафы в предбоксах (для одежды) и боксах;

– движение исследуемого материала;

– движение отработанного материала.



Условные обозначения: те же.

Приложение 2

Примерное размещение оборудования в рабочих зонах ПЦР-лаборатории

Для обработки материала

1. Бокс биологической безопасности III класса защиты (допускается использование бокса 2 ШНЖ, например, фирмы «Изотоп» и др.) или бокса биологической безопасности II класса защиты.
2. Центрифуга для пробирок объемом 5—100 мл.
3. Центрифуга/вортекс.
4. Микроцентрифуга до 16 000 g для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5 мл.
5. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °С.
6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.
7. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
8. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 мл.
9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1 000 мкл.
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл.
11. Штативы для наконечников, микропробирок объемом 1,5 мл.
12. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С, минус 20 °С и минус 70 °С (при необходимости длительного хранения материала).
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Для выделения НК

1. Бокс биологической безопасности II или III класса биозащиты.
2. Центрифуга/вортекс.
3. Микроцентрифуга от 12 до 16 000 g для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5 мл.
4. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °С.
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1 000 мкл.
9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл.
10. Штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 мл.
11. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С, минус 20 °С.

Для проведения обратной транскрипции и амплификации

1. Бокс биологической безопасности II класса или настольный бокс с бактерицидной лампой.
2. Амплификатор.
3. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.

4. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0.5 (0,2) мл.

5. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл, свободные от РНКаз.

6. Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 (0,2) мл.

7. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С, минус 20 °С.

8. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

Для электрофоретического анализа продуктов ПЦР

1. Камера для горизонтального электрофореза.

2. Источник постоянного тока с напряжением 150—460 В.

3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.

4. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов.

5. Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в чистой зоне и предназначенным для анализа результатов электрофореза).

6. Аквадистиллятор.

7. Микроволновая печь для плавления агарозы.

8. Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы объемом 250 мл.

9. Мерный цилиндр объемом 1 л.

10. Штатив для микропробирок на 0,5 мл.

11. Отдельная автоматическая пипетка 10—40 мкл.

12. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл в штативе.

13. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С.

14. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

15. Пластиковая емкость объемом 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

Для гибридизационно-ферментной детекции продуктов ПЦР

1. Термостат планшетный, поддерживающий температуру 37 °С.

2. Вошер (не обязательно).

3. Планшетный спектрофотометр.

4. Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в чистой зоне и предназначенным для анализа результатов гибридизации).

5. Восьмиканальная пипетка до 200 мкл.

6. Отдельный набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема.

7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема.

8. Мерный цилиндр объемом 1 л.

9. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С.

10. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

Приложение 3

Использование средств индивидуальной защиты в рабочих зонах ПЦР-лаборатории

<table>
<tr><th rowspan="2">Этап ПЦР-анализа (рабочая зона)</th><th rowspan="2">Вирусы I группы</th><th colspan="2">Вирусы II группы</th><th rowspan="2">Чума, сап, мелиоидоз</th><th rowspan="2">Глубокие микозы</th><th rowspan="2">Бруцеллез, туляремия, сибирская язва</th><th rowspan="2">Риккетсиозы</th><th rowspan="2">Холера</th></tr>
<tr><th>КГЛ, ТОРС, ГЛПС, ОГЛ</th><th>Другие</th></tr>
<tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td></tr>
<tr><td colspan="9">I. Блок для работы с инфицированными животными</td></tr>
<tr><td>Прием, разбор, первичная обработка клинического материала от больных с неясной этиологией (не исключая наличия вирусов I группы)</td><td colspan="8">В условиях максимально изолированных лабораторий ИСИЗ или боксы биологической безопасности III класса + защитная одежда IY типа + РП</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Прием, разбор, первичная обработка:
• клинического материала от больных с подозрением на ООИ;
• проб объектов окружающей среды</td><td rowspan="2">ИСИЗ[1] или БББ III класса + IY тип + РП[2]</td><td colspan="8">при наличии возможности устанавливают бокс биологической безопасности (БББ) II или III класса</td></tr>
<tr><td>I тип</td><td>II тип</td><td>I тип</td><td>I тип</td><td>II тип</td><td>II тип</td><td>IV тип + РП</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Подготовка проб, выделение нуклеиновых кислот</td><td rowspan="2">ИСИЗ или БББ III класса + IY тип + РП</td><td colspan="8">бокс биологической безопасности II класса</td></tr>
<tr><td>I тип</td><td>II тип</td><td>I тип</td><td>I тип</td><td>II тип</td><td>II тип</td><td>IV тип + РП</td></tr>
<tr><td colspan="9">II. Боксированное помещение (микробиологический бокс с предбоксом)</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Прием, разбор, первичная обработка материала</td><td rowspan="3">ИСИЗ или БББ III класса + IV тип + РП</td><td colspan="8">бокс биологической безопасности II класса</td></tr>
<tr><td>I тип</td><td>IV тип + респиратор + РП</td><td>IV тип + РП + респиратор (мелиоидоз)</td><td>IV тип + РП + респиратор</td><td>IV тип + РП</td><td>IV тип + РП + респиратор</td><td>IV тип + РП</td></tr>
<tr><td colspan="8">бокс биологической безопасности III класса</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>I тип</td><td>II тип</td><td>I тип</td><td>I тип</td><td>I тип</td><td>II тип</td><td>IV тип + РП</td></tr>
</table>

Продолжение прилож. 3

<table>
<tr><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th></tr>
<tr><td rowspan="3">Подготовка необеззараженных проб, выделение нуклеиновых кислот</td><td rowspan="3">ИСИЗ или БББ III класса + IY тип + РП</td><td colspan="7">бокс биологической безопасности II класса</td></tr>
<tr><td>I тип</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>Y тип + РП + респиратор (мелиоидоз)</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + РП</td></tr>
<tr><td colspan="7">бокс биологической безопасности III класса</td></tr>
<tr><td></td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Подготовка обеззараженных проб, выделение нуклеиновых кислот</td><td colspan="3" rowspan="2">Отсутствуют регламентированные способы обеззараживания</td><td>ББББ II класса</td><td rowspan="2">Отсутствуют регламентированные способы обеззараживания</td><td>ББББ II класса</td><td rowspan="2">Отсутствуют регламентированные способы обеззараживания</td><td>ББББ II класса</td></tr>
<tr><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации (необеззараженные пробы)</td><td rowspan="3">ИСИЗ или ББББ III класса + IY тип + РП</td><td colspan="7">бокс биологической безопасности II класса</td></tr>
<tr><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + РП + респиратор (мелиоидоз)</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + РП</td></tr>
<tr><td colspan="7">при отсутствии бокса биологической безопасности</td></tr>
<tr><td></td><td>I тип</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + РП + респиратор (мелиоидоз)</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + респиратор + РП</td><td>IY тип + РП</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации (обеззараженные пробы)</td><td colspan="3" rowspan="2">Отсутствуют регламентированные способы обеззараживания</td><td>ПЦР-бокс</td><td rowspan="2">Отсутствуют регламентированные способы обеззараживания</td><td>ПЦР-бокс</td><td rowspan="2">Отсутствуют регламентированные способы обеззараживания</td><td>ПЦР-бокс</td></tr>
<tr><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td><td>IY тип + РП</td></tr>
</table>

Продолжение прилож. 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации (обеззараженные пробы)	ИСИЗ или БББ III класса + IY тип + РП	при наличии возможности устанавливают ПЦР-бокс						
		I тип (при наличии БББ II класса + IY тип + РП + респиратор)	IY тип + РП + респиратор	IY тип + РП	IY тип + РП + респиратор	IY тип + РП	IY тип + РП + респиратор	IY тип + РП

Примечания.

[1] ИСИЗ – изолирующие средства индивидуальной защиты (пневмокостюмы или их аналоги).
[2] РП – резиновые или латексные перчатки.

Приложение 4

Обеззараживание исследуемого материала

1. Материал, подозрительный на зараженность бактериями I—II групп патогенности, не образующими споры.

1.1. К исследуемым образцам добавляют мертиолят натрия до концентрации 1 : 10 000 (0,01 %) с последующим прогреванием их при 56 °С в течение 30 мин. После обработки мертиолятом натрия 100 мкл образца переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий раствор на основе 6М гуанидинтиоизоцианата в объеме, указанном в инструкции к тест-системе, и инкубируют 15 мин при 65 °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

1.2. Обеззараживание проб, подозрительных на зараженность возбудителем холеры: пробы исследуемого материала обеззараживают путем их прогревания при 100 °С в течение 30 мин.

2. Материал, подозрительный на зараженность бактериями, образующими споры (*Bacillus anthracis*).

Исследуемый материал в количестве 0,1 мл засевают в пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера, pH 7,2 ± 0,1 и инкубируют с аэрацией при 37 °С в течение 2,5 ч. Добавляют пенициллин до конечной концентрации 1 000 ед/мл и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин. Затем прогревают на водяной бане 10 мин при температуре 100 °С, после чего 100 мкл обработанных, как описано выше, образцов переносят в пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий раствор (по п. 1.1) и инкубируют 15 мин при 65 °С.

Приложение 5

Режимы дезактивации при постановке ПЦР

1. Дезактивация буфера и гелей, содержащих бромид этидия

1.1. Первый способ

Необходимые реагенты для обработки 1 л буфера и гелей: 0,5 М перманганат калия – 1 л; 2,5 М соляная кислота – 1 л; 2,5 М NaOH – 1 л.

Порядок работы: отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4—6 ч. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

1.2. Второй способ

Необходимые реагенты: стеклянная колонка емкостью на 1—2 л; активированный уголь.

Порядок работы: заполнить колонку активированным углем и пропускать отработанный буфер через нее небольшими порциями. Дезактивированный раствор можно сливать в канализацию. Гели дезактивировать первым способом.

2. Дезактивация исследуемого материала и выделенных НК

2.1. При отсутствии проходного автоклава клинический материал, выделенные НК подвергают обеззараживанию в одноразовых пластиковых емкостях путем замачивания в дезинфицирующем растворе (режим обеззараживания согласно приложению 1 к СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2.2. По истечении времени экспозиции дезинфицирующий раствор сливают, открытую емкость с обработанным материалом упаковывают в плотный термостойкий пакет и относят в автоклавную для последующего обеззараживания паром под давлением.

2.3. Проводят обеззараживание паром под давлением в следующем режиме: температура 132 ± 2 °С, давление 2,0 кГс/см^2 (0,2 МПа), время – 60 мин.

2.4. После обеззараживания паром под давлением пакет с инактивированным материалом выносят в контейнер для мусора с последующим вывозом на полигон бытовых отходов.

2.5. При наличии проходного автоклава клинический материал собирают в одноразовые термостойкие пластиковые емкости (либо термостойкие пакеты) и обеззараживают, как указано в п. 2.3.

3. Дезактивация пробирок с ампликонами, наконечников, перчаток

3.1. Пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе после 1-го этапа амплификации (в случае выполнения двухэтапной ПЦР с вложенными праймерами) из зоны проведения ПЦР собирают в однора-

зовые пластиковые емкости и выносят в зону детекции результатов для последующей инактивации.

3.2. В зоне детекции результатов наконечники, пробирки с ампликонами (с предварительно открытыми крышками), перчатки, ветошь после окончания работы погружают на 1 ч в одноразовую пластиковую емкость, содержащую 5 %-ный раствор хлорамина Б или 0,2 %-ный раствор ДП-2Т.

3.3. По истечении времени экспозиции дезинфицирующий раствор сливают, открытую емкость с обработанным материалом помещают в плотный термостойкий пакет для последующего обеззараживания материала паром под давлением 2,0 кГс/см^2 (0,2 МПа), при температуре 132 ± 2 °С, в течение 60 мин.

3.4. После обеззараживания пакет с инактивированным материалом выносят в контейнер для мусора с последующим вывозом на полигон бытовых отходов.

4. Обработка рабочей одежды

4.1. Рабочую одежду сотрудников лаборатории маркируют индивидуально и в соответствии с зональным распределением, ее смену проводят не реже одного раза в неделю. В зоне детекции результатов желательно использовать одноразовую рабочую одежду, которую обрабатывают способом, описанным в разделе 3.

4.2. Стирку рабочей одежды сотрудников проводят в прачечной организации или в лаборатории. Не допускается одновременно производить стирку рабочей одежды разных зон.

4.3. Сдачу «грязной» и выдачу «чистой» рабочей одежды производят с соблюдением поточности и разделяют во времени.

4.4. Рабочую одежду сотрудников подвергают замачиванию в емкостях с дезинфицирующим раствором (0,1 %-ный раствор ДП-2Т в течение 60—120 мин, 0,5 %-ный раствор хлорамина Б в течение 30 мин) при норме расхода средства 5 л на 1 кг сухого белья. Емкость закрывают крышкой. По окончанию дезинфекции белье складывают в клеенчатые мешки. Стирку проводят со стиральным порошком при температуре 95—100 °С.

4.5. Защитные очки, сменную обувь сотрудников дезинфицируют 1 %-ным раствором хлорамина Б или 0,2 %-ным раствором ДП-2Т (2-кратное протирание). Остатки раствора удаляют ветошью, смоченной водой, и проводят обеззараживание ультрафиолетовым излучением влажных поверхностей в течение 1 ч.

Приложение

Действия при контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами

1. Сотрудников, проводящих мероприятия по деконтаминации, обеспечивают одноразовыми халатами, шапочками, бахилами и перчатками, одноразовой ветошью емкостями для приготовления необходимых количеств моющих и дезинфицирующих растворов.

2. Каждую зону лаборатории обрабатывают сотрудники, работающие в ней.

3. Для обработки каждой зоны используют новый набор уборочного инвентаря.

4. Каждую зону лаборатории разбивают на участки уборки, например:

- участок 1 – бокс биологической безопасности и оборудование внутри него;
- участок 2 – внешние поверхности бокса биологической безопасности;
- участок 3 – шкафы для расходного материала;
- участок 4 – холодильники для хранения реактивов, образцов проб;
- участок 5 – оборудование, которое используют в работе, но стоит вне бокса биологической безопасности;
- участок 6 – поверхности помещения (стены, окна, батареи, потолок, двери и т. д.);
- участок 7 – пол.

5. Обработку проводят от участка к участку последовательно. Каждый участок обрабатывают отдельной ветошью. Перед обработкой персонал надевает одноразовую одежду, бахилы, шапочки, перчатки; готовит моющие и дезинфицирующие растворы.

6. Поверхности каждого участка вначале обрабатывают моющим раствором для удаления жировых загрязнений, после чего остатки моющего средства удаляются ветошью, смоченной водой.

7. Затем на поверхность наносят на 30 мин 0,2 %-ный раствор ДП-2Т. Остатки дезинфицирующего средства тщательно удаляют ветошью, смоченной водой.

8. После завершения указанной обработки проводят обеззараживание влажных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч.

9. Мероприятия, описанные в п.п.7 и 8, повторяют еще раз.

10. Каждый последующий этап обработки проводят в новой одноразовой одежде (халат, шапочка, бахилы, перчатки) с использованием новой ветоши. Для удаления остатков нанесенных на поверхность дезинфицирующих средств ветошь тщательно прополаскивают в чистой воде, обрабатываемую поверхность протирают несколько раз. После каждого этапа обработки ветошь утилизируют.

11. По завершению деконтаминации берут повторные смывы, которые исследуют на наличие НК возбудителей инфекционных заболеваний, диагностика которых наиболее часто осуществляется в данной лаборатории, а также на выявление НК возбудителей, имеющих короткие – менее 300 п.н. – специфические продукты амплификации (длина специфического фрагмента указана в инструкциях к тест-системе).

12. Для проведения смывов стерильный зонд с ватным тампоном смачивают в ТЕ-буфере (10 mM Tris, 1mM ЭДТА) и вращательными движениями протирают рабочие поверхности оборудования, мебели дверных ручек, косяков, телефонов и т. п., особое внимание уделяя помещениям совместного посещения работников зоны детекции продуктов амплификации и других сотрудников лаборатории (столовая, санузел и т. п.). После взятия смыва зонд вращают в течение 10—15 с в пробирке типа «эппендорф» с 300—400 мкл ТЕ-буфера, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удаляют.

13. В случае получения в образцах смывов положительных результатов ПЦР-анализа обработку повторяют.

14. Загрязненный расходный материал (пробирки, наконечники и т. п.) утилизируют.

Приложение 7

Взятие материала на исследование

1. Взятие материала производят согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований для каждого вида возбудителя инфекций и в соответствии с СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2. С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортных сред различного состава в зависимости от вида исследуемого материала. При необходимости длительного хранения и транспортирования, при отсутствии низкотемпературных холодильников используют специальную транспортную среду ESP. Исследуемый материал может храниться в среде ESP при комнатной температуре (20—30 °С) в темном месте в течение 10 дней

- транспортная среда № 1: NaCl 137 мМ, KCl 2,7 мМ, NaH_2PO_4 10 мМ, K_2HPO_4 2 мМ, сыворотка крупного рогатого скота 20 %;
- транспортная среда № 2: сахароза 0,218 М, KH_2PO_4 0,0038 М, K_2HPO_4 0,0072 М, БСА 1 %;
- транспортная среда ESP: саркозил 1 %; ЭДТА 0,05 М; свободная от нуклеаз проназа Е 1 мг/мл.

3. Взятие биотического материала.

3.1. Кровь. Использование плазмы крови допустимо для проведения качественных и количественных исследований, использование сыворотки крови – только для проведения качественных исследований методом ПЦР.

Взятие материала. Для получения плазмы забор крови производят натощак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или специальную вакуумную систему типа «Venoject» (с ЭДТА), «Vacuett®» (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА). При взятии в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом (6 %-ный раствор ЭДТА в соотношении 1 : 20 или 3,8 %-ный раствор цитрата Na в соотношении 1 : 9). Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя! Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом).

Для получения сыворотки забор крови проводят натощак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или в стеклянную пробирку типа Vacuette® без антикоагулянта. При взятии в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую стеклянную пробирку.

Предварительная обработка проб. Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800—1 600 g (3 000 об./мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. После чего сгусток обводят пастеровской пипеткой и оставляют при комнатной температуре до образования сыворотки. По другому варианту кровь со сгустком центрифугируют при 800—1 600 g (3 000 об./мин) в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем сыворотку в количестве 1 мл переносят отдельными наконечниками с аэрозольным барьером (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб.

Образцы цельной крови:

- при температуре 2—25 °С – в течение 6 ч с момента взятия материала для количественного определения нуклеиновых кислот; в течение 12 ч – для качественного определения нуклеиновых кислот;
- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток для качественного определения ДНК/РНК инфекционных агентов.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Образцы плазмы и сыворотки:

- при температуре 2—8 °С – в течение 5 суток;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала, поэтому образцы плазмы или сыворотки для длительного хранения желательно разлить небольшими (0,1—0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Условия транспортирования материала и предварительно обработанных проб. Транспортирование клинического материала и предварительно обработанных проб осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом.

Образцы крови:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч с момента взятия материала для количественного определения нуклеиновых кислот; в течение 12 ч – для качественного определения нуклеиновых кислот.

Образцы плазмы и сыворотки:

- при температуре 2—8 °С – в течение 3 суток;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.2. Моча. *Взятие материала.* Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20—40 мл в специальный сухой стерильный флакон или сухую стерильную пробирку.

Предварительная обработка проб. Взбалтывают флакон с мочой. Переносят 10—20 мл мочи в центрифужные пробирки объемом 20—40 мл с завинчивающейся крышкой и центрифугируют 10 мин при 10 000 g (12 000 об./мин). Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавляют транспортную среду № 2 (см. п. 2) до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб.

Нативные и предварительно обработанные образцы мочи:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 20 °С – в течение 2 месяцев;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала и предварительно обработанных проб. Транспортирование клинического материала и предварительно обработанных проб осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.3. Фекалии. *Взятие материала.* Используют пробы фекалий массой (объемом) примерно 1—3 г (1—3 мл). Исследование мазков неинформативно из-за низкого со-

держания в них возбудителей. Фекалии забирают из предварительно продезинфицированного горшка или подкладного судна. Пробу в количестве 1 г (примерно) отдельным наконечником с аэрозольным барьером или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный флакон.

Предварительная обработка проб. При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию (при водянистой консистенции фекалий в виде прозрачной жидкости фекальную суспензию не готовят).

Приготовление фекальной суспензии. В соответствующее пробам количество микроцентрифужных пробирок (объемом 1,5 мл) вносят 0,9 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида). Состав фосфатного буфера: NaCl 137 мМ, KCl 2,7 мМ, NaH_2PO_4 10 мМ, K_2HPO_4 2 мМ; pH 7,5 + 0,2. В каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к 10—20 %-ной суспензии фекалий в фосфатном буфере (или стерильном изотоническом растворе натрия хлорида) добавляют глицерин в конечной концентрации 10—15 %. Подготовленные таким образом пробы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30—40 мин.

Приготовление бактериальной фракции фекалий для выявления бактериальных агентов. Для приготовления бактериальной фракции фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином. Пробирки с суспензией (водянистыми фекалиями) центрифугируют при 3 000 g (5 000 об./мин) в течение 5 мин. Отдельным наконечником с аэрозольным барьером из каждой пробирки отбирают надосадочную жидкость и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Затем центрифугируют при 10 000 g (12 000 об./мин) в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 0,2 мл фосфатного буфера (стерильного изотонического раствора натрия хлорида).

Приготовление осветленного экстракта фекалий для выявления вирусных агентов (ТОРС). Для приготовления осветленного экстракта фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином. Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируют на вортексе. Осветляют полученную суспензию путем центрифугирования при 10 000 g (12 000 об./мин) в течение 5 мин. Супернатант (0,1 мл) смешивают с отрицательным контрольным образцом (50 %-ная сыворотка крови крупного рогатого скота, разведенная фосфатно-солевым буфером, состав которого указан выше) (0,1 мл) в соотношении 1 : 1 и используют непосредственно для выделения РНК. При необходимости хранения супернатант отбирают в отдельную одноразовую пробирку.

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб.

Образцы нативных фекалий:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток.

Фекальная суспензия с глицерином, бактериальная фракция и осветленный фекальный экстракт:

- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала и предварительно обработанных проб. Транспортирование клинического материала и предобработанных проб осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом.

Образцы нативных фекалий:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток.

Предварительно обработанные пробы:

- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.4. Спинномозговая жидкость (ликвор). *Взятие материала.* Спинномозговую жидкость получают путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами. Взятие ликвора в количестве не менее 0,5—1 мл проводят в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

Предварительная обработка проб. Не требуется.

Условия хранения материала:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.5. Биопсийный и аутопсийный материал. *Взятие материала.* Микробиоптат (пунктат)/микроаутоптат помещают в микропробирки с закручивающимися крышками или пробирки объемом 1,5 мл с защелкой, содержащие 0,1 мл физиологического раствора или транспортной среды. Макробиоптат/макроаутоптат помещают в контейнер с физиологическим раствором или транспортной средой № 2 (см. п. 2).

Предварительная обработка проб. Микробиоптаты (пунктаты)/микроаутоптаты печени, селезенки и т. д., помещенные в микропробирки с закручивающимися крышками или пробирки объемом 1,5 мл с защелкой, содержащие 0,1 мл транспортной среды № 2 (см. п. 2), предварительной обработки не требуют. Далее выделение нуклеиновых кислот проводят согласно инструкции комплекта для выделения.

Макробиоптаты/макроаутоптаты. При выявлении вирусных агентов кусочки ткани массой 0,1—1 г помещают в охлажденную фарфоровую ступку и добавляют охлажденнный изотонической раствор объемом 0,5—1 мл. Измельчают стерильными ножницами с последующим растиранием пестиком. Через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость (0,1—0,2 мл) стерильным наконечником с аэрозольным барьером в стерильные микропробирки.

При выявлении бактериальных агентов процесс подготовки макробиоптатов/макроаутоптатов аналогичен, только ступку и изотонический раствор не охлаждают.

По другому способу биоптат непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот помещают в жидкий азот, затем аккуратно измельчают его пестиком в предварительно охлажденной жидким азотом фарфоровой ступке. Взвешивают 100 мг кусочков ткани и растирают их в ступке в жидком азоте до порошка. Затем для выделения РНК порошок переносят в гомогенизатор и следуют инструкции по выделению РНК. Для выделения ДНК к полученному порошку добавляют равный объем стерильного физиологического раствора (0,1 мл), тщательно перемешивают и отбирают необходимый объем материала, согласно инструкции для выделения ДНК.

Фарфоровая посуда, а также гомогенизаторы должны быть предварительно обработаны хромпиком и простерилизованы. При гомогенизации нескольких образцов необходимо после каждой пробы протирать поверхность стола 0,2 %-ным раствором

ДП-2Т, затем водой и 70 %-ным этиловым спиртом и менять перед обработкой следующей пробы перчатки.

Условия хранения материала. Образцы биопсийного и аутопсийного материала, предназначенного для выделения РНК:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Образцы биопсийного и аутопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч;
- в замороженном виде – в течение 1 суток (только для материала, предназначенного для выделения ДНК).

3.6. Мокрота. *Взятие материала.* Взятие материала осуществляют в количестве не менее 0,5 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы (пробирки) с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл.

Предварительная обработка проб. Перед выделением нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение мокроты, используя раствор «Муколизин» (Na_2HPO_4, 77,4 мМ, NaH_2PO_4, 22,6 мМ, β-МЭ, 99,4 мМ, 5 %-ный азид натрия в конечной концентрации 0,05 %). В емкость с мокротой добавляют «Муколизин» в соотношении 5 : 1 (5 частей «Муколизина» к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке емкости. В процессе разжижения мокроты (20—30 мин) емкость периодически встряхивают. Затем автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в пробирку с завинчивающейся крышкой или в микроцентрифужную пробирку с защелкой на 1,5 мл и центрифугируют при 8 000 g (10 000 об./мин) в течение 10 мин. В случае исследования на *бактериальные агенты* полностью удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя с колбой-ловушкой, осадок ресуспендируют в фосфатном буфере, доводя общий объем пробы до 0,1 мл. При исследовании на наличие *вирусных агентов* после центрифугирования отдельным наконечником с аэрозольным барьером отбирают 0,2 мл надосадочной жидкости в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.7. Бронхо-альвеолярный лаваж или промывные воды бронхов. *Взятие материала.* Взятие материала осуществляют в одноразовые, плотно завинчивающиеся пробирки объемом 50 мл.

Предварительная обработка проб. Промывные воды бронхов или бронхоальвеолярный лаваж перемешивают встряхиванием (вращением) пробирки. Автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл клинического материала, помещают в пробирку с завинчивающейся крышкой или пробирку с защелкой на 1,5 мл и центрифугируют при 7 000 g (10 000 об./мин) в течение 10 мин. Затем в случае исследования на *бактериальные агенты* аккуратно с помощью вакуумного отсасывателя с колбой-ловушкой отбирают супернатант, оставив 0,1 мл надосадочной жидкости. При исследовании на наличие *вирусных агентов* после центрифугирования отдельным наконечником с аэрозольным барьером отбирают 0,2 мл надосадочной жидкости в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.8. Мазки из полости носа. *Взятие материала.* Мазки (слизь) берут сухими стерильными ватными тампонами. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой № 2 (см. п. 2). Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращают зонд в течение 10—15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.

Предварительная обработка проб. Не требуется.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре 2—8 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.9. Мазки из ротоглотки. *Взятие материала.* Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с транс-

портной средой № 2 (см. п. 2). Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращают зонд в течение 10—15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.

Предварительная обработка проб. Не требуется.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре 2—8 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.10. Смывы из полости носа. ***Взятие материала.*** Взятие материала производят в положении больного сидя с отклоненной назад головой. Для получения смыва из полости носа в оба носовых хода поочередно с помощью зонда или одноразового шприца вводят по 3—5 мл теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Промывную жидкость из обоих носовых ходов собирают через воронку в одну стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного обеззараживания паром под давлением.

Предварительная обработка проб. Не требуется.

Условия хранения материала:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.11. Смывы из ротоглотки. ***Взятие материала.*** Перед взятием смывов из ротоглотки проводят предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки (в течение 10—15 с) 8—10 мл изотонического раствора натрия хлорида. Жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного обеззараживания паром под давлением.

Предварительная обработка проб. Не требуется.

Условия хранения материала:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С – в течение 6 ч;
- в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.12. Пунктат бубона. *Взятие материала.* Взятие материала производят стерильным шприцем. Если бубон имеет сохранившуюся кожу (невскрывшийся бубон), то ее протирают предварительно спиртом. Пункцию бубона производят как в его центре, так и на периферии. Из вскрывшегося бубона материал забирают в местах с сохраненной тканью, а также берут отделяемое бубона. Исследуемый материал в количестве 0,1—0,3 мл помещают в пробирку с транспортной средой № 2 или ESP (см. п. 2).

Предварительная обработка проб. Не требуется.

Условия хранения материала:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С или в замороженном виде – в течение 1 суток.

3.13. Везикулы, пустулы. *Взятие материала.* Перед взятием материала кожные элементы очищают ватным тампоном, смоченным эфиром или спиртом, затем прокалывают их у основания стерильной иглой или тонким капилляром пастеровской пипетки. Для ускорения поступления материала элемент сверху надавливают пинцетом. Корку или верхнюю часть везикул отделяют от кожи иглой, скальпелем. Исследуемый материал помещают в пробирку с транспортной средой № 2 или ESP (см. п. 2).

Предварительная обработка материала, условия хранения и транспортирования – как в п. 3.12.

4. Пробы из объектов окружающей среды.

Пробы окружающей среды транспортируют в лабораторию в течение не более 2—3 ч при температуре не выше 20 °С; если нет возможности транспортирования образцов, их хранят при температуре минус 20 °С (в течение 6 мес).

4.1. Пищевые продукты. *Взятие материала.* Пробы отбирают с соблюдением правил асептики в стерильные широкогорлые банки с помощью стерильной ложки, пинцета или ножа. Края банок обжигают над пламенем спиртовки. После закладки проб банки закрывают стерильной бумагой и перевязывают.

Предварительная обработка проб. Твердые пищевые продукты в количестве 1—10 г помещают в стерильную ступку, добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлорида в соотношении 1 : 10 и растирают до гомогенного состояния. Отстаивают и через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость, из которой проводят выделение ДНК. Жидкие пищевые продукты в объеме 0,2 мл переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для выделения ДНК.

Условия хранения материала:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия транспортирования материала. Транспортирование материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

- при температуре 2—8 °С или в замороженном виде – в течение 1 суток.

4.2. Клещи, комары и эктопаразиты (вши и блохи). *Взятие материала.* После взятия и доставки материала в лабораторию, комаров, клещей, блох и вшей усыпляют эфиром до обездвижения, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. После определения вида и пола материал может быть объединен в пулы в зависимости от вида, пола, места и даты сбора и помещен в сухие чистые пробирки объемом 1,5 мл.

Группировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.1027—01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций». При исследовании на чуму в одну пробу включают по 20—30 (не более 50) блох или мелких клещей, вшей. Иксодовых клещей при исследовании на чуму и другие природно-очаговые инфекции исследуют отдельно по фазам развития и в одну пробу берут пивших самок не более трех, голодных – до 30; нимф пивших – до 15, голодных – до 50; личинок пивших – до 30. При исследовании на туляремию в одну пробу объединяют до 50 имаго иксодовых клещей, 50—100 нимф и 100—200 личинок. Блох, гамазовых клещей, вшей исследуют до 100 особей в пробе. Из кровососущих двукрылых группируют пробы, включая в одну до 100 комаров, до 250 мошек и 20—25 слепней. При исследовании на арбовирусные инфекции комаров объединяют в пулы по 50—100 экземпляров. При необходимости проводят исследования отдельных особей.

Предварительная обработка проб:

- клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96 %-ного этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3—5 с при 2 000 g (5 000 об./мин) для удаления капель с крышки пробирки;
- с помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки;
- вносят в пробирку 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия, встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге в течение 3—5 с при 2 000 g (5 000 об./мин);
- с помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют раствор хлорида натрия из пробирки;
- переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7 мл 0,15 М раствора хлорида натрия и гомогенизируют пробу;
- наконечником с аэрозольным барьером переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 3 000 об./мин в течение 1 мин для осветления пробы.

РНК и ДНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

При выделении РНК и ДНК из комаров, блох и вшей используют данную методику обработки проб за исключением этапов отмывки в 96 %-ном этаноле и 0,15 М растворе хлорида натрия. Насекомых и комаров сразу гомогенизируют в стерильной ступке в 0,15 М растворе хлорида натрия.

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб. Материал после разбора и формирования проб:

- при температуре минус 20 °С в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С или в сосуде Дьюара с жидким азотом длительно.

Обработанный материал (после гомогенизации и осветления) хранится длительно при температуре минус 70 °С или в сосуде Дьюара с жидким азотом.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

4.3. Почва, трава, фураж, подстилка. *Взятие проб.* Пробы почвы с мест вероятного обсеменения патогенными микроорганизмами (мест вынужденного убоя скота,

стоянок и водопоя животных) берут в количестве 20—30 г на глубине до 15 см, на территории скотомогильников – на глубине до 2 м с помощью почвенных буров. При этом верхний слой почвы (2—3 см) снимают.

Пробы фуража берут из поверхностного слоя – не менее 400 г на 4 $м^2$ поверхности при незатаренном типе хранения. Из брикетированного корма срезают верхний слой брикета. Отбор проб проводят сухим стерильным пробным щупом. Пробы грубых кормов (сено, солома) берут из разных мест скирды при помощи ножниц и пинцета из расчета одна проба (40 г) на 4 $м^2$ площади скирды. Отобранные навески сена и соломы измельчают при помощи ножниц и пинцета на листе бумаги, затем помещают в банки. Зеленую массу, срезанную ножницами, помещают пинцетом в пробирку или в банку.

Предварительная обработка проб. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлорида 1 : 10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2—3 мин при 5 000 об./мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12 000 об./мин. Осадок ресуспендируют в 0,2—0,5 мл дистиллированной воды.

Условия хранения и транспортирования – как в п.4.1.

4.4. Вода, стоки, смывы. *Взятие проб.* Водопроводную воду и воду из поверхностных водоемов для исследования берут в количестве 1 л на одну пробу в двух объемах по 500 мл в стерильную посуду с непромокаемой пробкой. Из водопроводных кранов отбор проб воды производят после предварительного обжигания их спиртовым факелом и спуска воды в течение 10 мин при полном открытии крана.

Хозяйственно-бытовые сточные воды отбирают для исследования двумя способами: в объеме 1 л в двух емкостях по 500 мл или тампонами, приготовленными из марлевых салфеток размером 10 × 15 см в 10—15 слоев. Последние закрепляют у места забора воды, через 1 сутки помещают в стерильную банку, содержащую физиологический раствор.

Смывы с поверхностей берут стерильными ватными тампонами или марлевыми салфетками. Перед взятием смывов тампоны или салфетки смачивают стерильным физиологическим раствором. После взятия смыва тампон (салфетку) погружают в емкость с физиологическим раствором.

Предварительная обработка проб. Из отобранных образцов переносят по 125 мл в 4 центрифужных стакана объемом 250 мл с завинчивающимися крышками и центрифугируют в течение 15 мин при 12 000 об./мин. После чего осадок в каждом стакане ресуспендируют в 0,2 мл физиологического раствора. Полученные суспензии переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 8 000 g (12 000 об./мин) в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с аэрозольным барьером в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК используют 0,1—0,2 мл надосадочной фракции.

Условия хранения и транспортирования – как в п. 4.1.

3.2. ПРОФИЛАКТИКА ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Санитарно-паразитологическая оценка эффективности обеззараживания воды ультрафиолетовым излучением

Методические указания
МУ 3.2.1757—03

1. Разработаны авторским коллективом в составе: д. м. н. Н. А. Романенко, к. м. н. Г. И. Новосильцев (Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. М. Марциновского Московской медицинской Академии им. И. М. Сеченова); д. м. н. В. П. Сергиев (кафедра паразитологии, паразитарных и тропических болезней Московской медицинской Академии им. И. М. Сеченова); д. м. н. Ю. А. Рахманин, д. м. н. Р. И. Михайлова, к. м. н. И. Н. Рыжова (Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина, РАМН); к. ф. м. н. С. В. Костюченко, С. В. Волков, А. В. Якименко (НПО «ЛИТ» ЗАО); д. м. н. Н. Ф. Соколова (НИИ дезинфектологии); к. б. н. Т. Н. Цыбина (Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России); Е. Г. Белова (Центр госсанэпиднадзора в г. Москве); к. м. н. Л. И. Мельникова (ЦМСЧ 165, Медбиоэкстрем МЗ РФ); к. т. н. В. В. Гутенев (РАГС при Президенте РФ); А. В. Бунаков, М. В. Грибинюк, А. Н. Борзосеков (Центр госсанэпиднадзора в Курской области); Н. С. Малышева, Ю. Ф. Мелехов, И. П. Балабина, Н. А. Самофалова (Курский педагогический университет); Т. Я. Погорельчук, В. А. Олейник (Центр госсанэпиднадзора в г. Белгород-Днестровске); В. И. Евдокимов, В. В. Евдокимов, В. И. Пивень (Центр госсанэпиднадзора в Белгородской области).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Министерстве здравоохранения Российской Федерации (протокол № 15 от 21 ноября 2002 г.).

3. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 28 сентября 2003 г.

3. Введены впервые.

Содержание

1. Область применения 126

2. Нормативные ссылки 126

3. Общие положения 127

4. Санитарно-паразитологическая оценка эффективности использования ультрафиолетового метода обработки воды 128

Приложение 1. Термины, понятия, определения и единицы измерения 130

Приложение 2. Максимальные значения физико-химических показателей качества питьевой и сточной воды, подаваемой на обеззараживание УФ-излучением от паразитарных патогенов 131

Приложение 3. Биоцидное действие ультрафиолетового излучения в отношении возбудителей паразитарных кишечных заболеваний 131

Библиографические данные 132

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
28 сентября 2003 г.
Дата введения: с момента утверждения.

3.2. ПРОФИЛАКТИКА ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Санитарно-паразитологическая оценка эффективности обеззараживания воды ультрафиолетовым излучением

Методические указания
МУ 3.2.1757—03

1. Область применения

Настоящие методические указания предназначены для специалистов органов и учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы, а также могут быть использованы организациями, деятельность которых связана с проектированием, строительством, реконструкцией и эксплуатацией водных объектов.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон Российской Федерации «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52-ФЗ от 30.03.99.

2.2. СанПиН 2.1.4.1074—00 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

2.3. СанПиН 2.1.2.1188—03 «Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества».

2.4. СанПиН 3.2.1333—03 «Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации».

2.5. СанПиН 2.1.5.980—00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод».

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

2.7. ГОСТ 2761—84 «Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения. Гигиенические, технические требования и правила выбора».

2.8. МУ 4.2.964—00 «Санитарно-паразитологическое исследование воды хозяйственного и питьевого использования».

2.9. МУ 2.1.4.719—98 «Санитарный надзор за применением ультрафиолетового облучения в технологии подготовки питьевой воды».

2.10. МУ 2.1.5.732—99 «Санитарно-эпидемиологический надзор за обеззараживанием сточных вод ультрафиолетовым излучением».

2.11. МУ 2.1.2.694—98 «Использование ультрафиолетового излучения при обеззараживании воды плавательных бассейнов».

2.12. МУ 2.1.5.800—99 «Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод».

3. Общие положения

3.1. Среди паразитарных патогенов непосредственную угрозу здоровью человека при их заглатывании с водой чаще всего представляют:

Лямблии (Lamblia intestinalis, Giardia lamblia) – одноклеточные паразитические животные организмы из класса жгутиковых (Mastigofora), возбудители лямблиоза. Заболевание проявляется в различных формах: от кишечной с диарейным синдромом и другими дисфункциями со стороны желудочно-кишечного тракта и гепато-билиарной системы, до нервной, проявляющейся в виде головных болей, раздражительности, слабости, крапивницы, а также может проявляться аллергическими реакциями различного типа. Лямблии могут существовать в двух формах: вегетативной (в организме хозяина) и цистной. Заражение человека происходит при заглатывании цист, в том числе из воды, куда они попадают с фекалиями больного (паразитоносителя).

Цисты лямблий морфологически представляют собой овальные образования с двухконтурной оболочкой и характерной внутриклеточной структурой, размером 6—8 × 10—14 мкм, устойчивые к воздействию факторов окружающей среды и обеззараживающим химическим агентам, способны к длительному переживанию (до 3-х месяцев) в водной среде. Заражающая доза – 10 экз.

Криптоспоридии (Cryptosporidium parvum) – одноклеточные паразитические животные организмы из класса споровиков (Sporozoa) со сложным жизненным циклом – возбудители криптоспоридиоза человека и животных. Заболевание характеризуется частой водянистой диареей, рвотой, лихорадкой, головной болью, спастическими болями в животе, миалгией. В водную среду криптоспоридии попадают вместе с фекалиями больного (паразитоносителя), где представлены в виде ооцист. Заражение происходит при их проглатывании.

Ооцисты криптоспоридий – это сферические или овоидные образования размером 4—6 мкм, содержащие внутри себя 4 спорозоита – клеток-носителей инвазионности, предназначенных для продолжения жизненного цикла криптоспоридий. Ооцисты способны к длительному переживанию (до 3—4-х месяцев) в водной среде и резистентны ко многим дезинфектантам, используемым при подготовке питьевой воды. Заражающая доза – 30 экз.

Остpицы (Enterobius vermicularis) – круглые гельминты (нематоды) длинной 5—8 мм – возбудители энтеробиоза, заболевания, характеризующегося анальным зудом, крапивницей, болями в животе, снижением иммунитета. Чаще болеют дети. Заражение происходит при заглатывании яиц остриц с рук, объектов окружающей среды, в том числе из воды. В водную среду яйца гельминта попадают от больного человека. Заражающая доза – 3—5 экз.

Яйца остриц – асимметричные овально вытянутые образования. Одна сторона заметно уплотнена, другая выпукла. Размер яиц 50—60 × 30—32 мкм. Оболочка тонкая, гладкая и бесцветная. Яйца могут быть на различных стадиях созревания, до головастикоподобной личинки включительно. Могут встречаться в недостаточно очищенной питьевой воде и воде плавательных бассейнов. В водной среде сохраняют жизнеспособность и инвазионность в течение нескольких суток.

Цепень карликовый (Hymenolepis nana) – плоский ленточный гельминт (цестода) длиной 15—30 мм – возбудитель гименолепидоза, длительного глистного заболевания, сопровождающегося поносами, запорами, болями в животе, пониженным аппетитом, исхуданием, головными болями, бессонницей и повышением температуры. Во внешней

водной среде гельминт представлен яйцами в виде образований овальной формы размером 40 × 50 мкм с длинными нитевыми придатками на полюсах. В воде яйца сохраняют инвазионность в течение нескольких суток. Заражающая доза – 3—5 экз.

3.2. Содержание возбудителей кишечных паразитозов в воде, прошедшей подготовку на очистных сооружениях с 95—99 %-ной эффективностью, может колебаться

в питьевой воде:

цисты лямблий	– до 10 экз. в 1 л;
ооцисты криптоспоридий	– до 40 экз. в 1 л;
яйца гельминтов	– 0 экз.;

в сточной воде:

цисты лямблий	– до 40 экз. в 1 л;
ооцисты криптоспоридий	– до 60 экз. в 1 л,
яйца гельминтов	– до 10—20 экз. в 1 л.

4. Санитарно-паразитологическая оценка эффективности использования ультрафиолетового метода обработки воды

4.1. В биологически активной области спектра (205—315 нм) ультрафиолетовое (УФ) излучение обладает выраженным биоцидным действием в отношении различных микроорганизмов, включая пропагативные формы возбудителей паразитарных кишечных болезней, таких как цисты и ооцисты патогенных простейших кишечника и яйца гельминтов.

4.2. Ультрафиолетовое излучение может быть использовано для обеззараживания воды (питьевой, плавательных бассейнов, сточной) от паразитарных патогенов после предварительной водоподготовки, обеспечивающей ее основные показатели качества (прилож. 2).

4.3. Эпидемическая безопасность воды по паразитологическим показателям достигается при обеззараживании ее УФ-облучением в дозах: для питьевой воды – 40—45 мДж/см^2, сточной – не менее 65 мДж/см^2.

4.4. При эксплуатации УФ-оборудования, используемого на водных объектах, проводится систематический производственный контроль эффективности УФ-обеззараживания в соответствии с методическими указаниями МУ 4.2.964—00 «Санитарно-паразитологическое исследование воды хозяйственного и питьевого использования» с идентификацией обнаруженных паразитарных патогенов и их количества в воде, подаваемой на УФ-обеззараживание.

4.5. Согласование технологии очистки воды с использованием УФ-излучения проводится территориальными центрами госсанэпиднадзора на основе анализа следующих документов (материалов):

- обоснования выбора типа УФ-установки с учетом максимального расхода обрабатываемой воды, максимального коэффициента поглощения УФ-излучения водой и максимального уровня паразитологического загрязнения воды;
- паспорта на УФ-установку;
- гигиенического сертификата и сертификата соответствия.

4.6. В паспорте установок УФ-обеззараживания должны быть указаны следующие параметры:

- эффективная доза облучения, ее зависимость от расхода воды;
- максимальный коэффициент поглощения воды, при котором; обеспечивается эффективная доза;
- ресурс УФ-ламп;
- регламент-процедура обслуживания установки, в т. ч. поверки метрологического оборудования при использовании бактериостатиков-синергетиков хлорсодержащих, ионов (ионных комплексов) ряда металлов и их солей (например Ag^{+}, Cu^{2+}, $Ag(NH_3)_2$).

4.7. Соответствие эффективной дозы указанному в паспорте значению подтверждается сертификатом соответствия.

4.8. Обеспеченность контроля за надежностью УФ-установок оценивается по наличию:

- датчиков измерения интенсивности УФ-излучения в камере обеззараживания;
- системы автоматики, гарантирующей звуковой и световой сигналы при снижении минимальной заданной дозы;
- счетчиков времени наработки ламп и индикаторов их исправности;
- системы механической или химической очистки кварцевых чехлов, позволяющей производить процесс очистки без разборки и демонтажа установки.

4.9. Защита от возможного неблагоприятного воздействия УФ-излучения на обслуживающий персонал должна быть регламентирована условиями техники безопасности и обеспечена конструкцией УФ-установок, гарантирующей отсутствие выхода УФ-излучения за пределы камеры обеззараживания.

4.10. Организация и проведение государственного санитарно-эпидемиологического надзора за эксплуатацией УФ-установок осуществляется в соответствии с нормативно-методическими документами в плановом порядке и по санитарно-эпидемиологическим показателям.

Приложение 1

**Термины, понятия,
определения и единицы измерения**

№ п/п	Термины	Понятия, определения	Ед. измерения
1	2	3	4
1	Паразитарные агенты, паразитарные патогены	Пропагативные стадии возбудителей кишечных паразитарных болезней (протозоозов, гельминтозов) – цисты и оцисты патогенных кишечных простейших, яйца и личинки гельмитов	экз.
2	Ультрафиолетовое излучение	Электромагнитное излучение с длиной волны 10—400 нм	нм
3	Биоцидное излучение	Электромагнитное излучение УФ-диапазона с длиной волны 205—315 нм	нм
4	Биоцидное действие излучения	Гибель цист простейших и яиц гельминтов под воздействием биоцидного излучения	–
5	Источник УФ-излучения	Искусственный источник световой энергии, в спектре которого имеется биоцидное излучение	–
6	Мощность источника УФ-излучения	Суммарная световая энергия, излучаемая источником в УФ-диапазоне	Вт
7	Интенсивность излучения	Отношение потока излучения к площади поверхности	мВт/с $м^2$
8	Время облучения	Время, в течение которого происходит обеззараживание посредством УФ-облучения	с
9	Доза УФ-облучения	Мера обеззараживающего воздействия УФ-излучения	мДж/с $м^2$
10	Биоцидный эффект	Количественная оценка действия биоцидного излучения (отношение числа погибших цист простейших и (или) яиц гельминтов к исходному количеству жизнеспособных патогенов)	%
11	УФ-установка	Устройство для обеззараживания воды УФ-излучением	–
12	Камера обеззараживания	Основной элемент УФ-установки, в котором происходит процесс обеззараживания воды	–
13	Расход воды	Объем воды, протекающей через камеру в единицу времени	$м^3$/с
14	Кварцевый чехол	Устройство, препятствующее прямому доступу воды к УФ-лампе и стабилизирующее ее тепловой режим	–
15	Коэффициент поглощения	Отношение потока УФ излучения, поглощенного слоем воды толщиной 1 см, к падающему потоку УФ-излучения	–
16	Ресурс УФ-ламп	Определенная паспортом продолжительность работы ламп до их замены	ч
17	Время наработки УФ-ламп	Время, в течение которого УФ-лампы находились в рабочем состоянии	ч
18	Датчик-приемник УФ-излучения	Устройство, измеряющее интенсивность УФ-излучения в камере обеззараживания	–

Приложение 2

Максимальные значения физико-химических показателей качества питьевой и сточной воды, подаваемой на обеззараживание УФ-излучением от паразитарных патогенов

№ п/п	Показатель качества	Питьевая вода	Сточная вода
1	Взвешенные вещества (мг/л)	0	10
2	Цветность (градусы)	50	50
3	$БПК_5$ (мг O_2/л)	0	10
4	ХПХ (мг O_2/л)	0	50
5	Мутность (ЕМФ)	2,6	3,4
6	Содержание железа (мг/л)	< 0,3	<1,0
7	Водородный показатель (pH) в пределах	> 6<9	> 6<9

Приложение 3

Биоцидное действие ультрафиолетового излучения в отношении возбудителей паразитарных кишечных заболеваний

№ п/п	Виды паразитарных патогенов	Биоцидное действие УФ-излучения, обеспечивающее инактивацию 99,99 % паразитарных патогенов			
		Питьевая вода		Сточная вода	
		содержание (экз./л)	доза ($мДж/см^2$)	содержание (экз./л)	доза ($мДж/см^2$)
1	Цисты лямблий (Lamblia intestinalis) (синоним Giardia))	до 100	40	до 1 000	65
2	Ооцисты криптоспоридий (Cryptosporidium sp.)	до 100	45	до 1 000	65
3	Яйца острицы (Enterobius vermicularis)	–	–	до 100	65
4	Яйца карликового цепня (Hymenolepis nana)	–	–	до 100	65

Библиографические данные

1. Правила технической эксплуатации электроустановок потребителей и правила техники безопасности при эксплуатации электроустановок потребителей. М.: Энергоатомиздат, 1986.

2. Соколов В. Ф. Обеззараживание воды бактерицидными лучами. М., 1961.

3. Потапченко Н. Г., Славук О. С. Использование УФ-излучения в практике обеззараживания воды // Химия и технология воды. 1989. Т. 13. № 12. С. 1117—1129.

4. Методические указания по фотометрическому определению озона в воздухе, № 1639—77.

5. Бейер Т. В. Лабораторная диагностика криптоспоридиоза у детей. Ленинград, 1987.

6. Романенко Н. А., Новосильцев Г. И., Сергиев В. П. и др. О необходимости включения ооцист криптоспоридий в число показателей эпидемической безопасности питьевой воды на территории Российской Федерации // Материалы IV-го Международного конгресса «Экватек—2000» (Вода: экология и технология). М., 2000. С. 773.

7. Волков С. В. и др. Применение УФ излучения для обеззараживания воды в системах подготовки питьевой воды из поверхностных источников водоснабжения // Ж. ВСТ. 2000. № 2. С. 12—16.

8. Романенко Н. А., Новосильцев Г. И., Рахманин Ю. А. и др. Влияние ультрафиолетового излучения на ооцисты криптоспоридий и цисты лямблий в питьевой воде // Ж. «Гигиена и санитария». 2002. № 1. С. 33—36.

9. Влияние ультрафиолетового излучения при обеззараживании воды плавательных бассейнов: МУ 2.1.2.694—98.

10. Новиков Ю. В., Цыплакова Г. В., Тулакин А. В. и др. Гигиенические аспекты обеззараживания сточных вод ультрафиолетовым излучением // Ж. «Гигиена и санитария». 2000. № 1. С. 12—15.

11. Романенко Н. А.. Падченко И. К., Чебышев Н. В. Санитарная паразитология: Руководство для врачей. М.: Медицина, 2000. 320 с.

12. UV Usage and goverment regulation. What you need to know // J.Water Conditioning Purification. 1997. June. P. 38—42.

4.3. ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Санитарно-эпидемиологическая оценка и эксплуатация аэроионизирующего оборудования

Методические указания
МУ 4.3.1517—03

1. Настоящие методические указания разработаны НИИ медицины труда РАМН и Научно-экологическим центром им. А. Л. Чижевского, научной группой в составе: Ю. П. Пальцев (НИИ Медицины труда РАМН), В. А. Петров (Научно-экологический центр им. А. Л. Чижевского), В. В. Матвиенко (6-й ЦВКГ МО РФ), С. В. Колерский (ВНИИФТРИ Госстандарта РФ), А. А. Шилкин (НППФ «Тонда»), С. А. Смирнова (РНЦВМиК МЗ РФ).

Методические указания подготовлены с учетом замечаний и предложений следующих специалистов и научных коллективов: НИИ медицины труда РАМН (Н. Ф. Измеров, Г. А. Суворов, Р. Ф. Афанасьева), Научно-экологический центр им. А. Л. Чижевского (С. С. Карсов), НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды РАМН им. Н. А. Сысина (Ю. Д. Губернский), НИИ дезинфектологии МЗ РФ (М. Г. Шандала), РГМУ МЗ РФ (Ю. П. Пивоваров), НИИ труда Минтруда РФ (Н. К. Кульбовская), ВНИИФТРИ Госстандарта РФ (В. М. Балаханов), СПб ГУ аэрокосмического приборостроения Минобразования РФ (В. И. Турубаров), МИФИ Минобразования РФ (А. И. Мурашов, А. А. Котляров), МГАПИ Минобразования РФ (В. К. Шумилин), Экоцентр МО РФ (А. П. Кондратов), 736-й ЦСЭН МО РФ (В. Н. Русаков, В. К. Лукин), СЗНЦГиОЗ МЗ РФ (В. Н. Никитина, А. А. Дударев), ФЦ ГСЭН МЗ РФ (А. В. Стерликов), комитет по новой медицинской технике МЗ РФ (Т. И. Носкова), Департамент госсанэпиднадзора МЗ РФ (А. И. Кучеренко).

В создании настоящих методических указаний были использованы работы: СЭС Государственного лечебно-оздоровительного объединения (А. Ф. Халангот) и НИИ гигиены труда и профзаболеваний РАМН (Ю. В. Мойкин).

2. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации 29 июня 2003 г. Введены в действие с 30 июня 2003 г. Введены впервые.

Содержание

1. Общие положения и область применения 135

2. Общие требования к проведению санитарно-эпидемиологической оценки 136

3. Общие требования к эксплуатации 139

Приложение 1. Оборудование для контроля и нормализации аэроионного состава воздуха 142

Приложение 2. Термины и определения 143

Библиографические данные 144

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
29 июня 2003 г.
Дата введения: 30 июня 2003 г.

4.3. ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Санитарно-эпидемиологическая оценка и эксплуатация аэроионизирующего оборудования

Методические указания
МУ 4.3.1517—03

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – *указания*) разработаны в соответствии с Федеральным законом «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ (Собрание законодательства Российской Федерации, 1999, № 14, ст. 1650), Положением о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554 (Собрание законодательства Российской Федерации, 2000, № 31, ст. 3295) и действующими санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами, устанавливающими нормируемые показатели аэроионного состава воздуха производственных и общественных помещений.

1.2. Указания действуют на всей территории Российской Федерации и распространяются на следующее аэроионизирующее оборудование отечественного и импортного производства (включая встраиваемое в состав иного оборудования), допускаемое к применению в санитарно-эпидемиологических* и лечебных целях:

- электрические аэроионизаторы;
- радионуклидные аэроионизаторы;
- гидроаэроионизаторы;
- галогенераторы;
- галокамеры;
- спелеоклиматические камеры;
- карстовые пещеры;
- электростатические фильтры;
- деионизаторы.

1.3. Указания направлены на предотвращение неблагоприятного влияния на здоровье человека аэроионной недостаточности и избыточного содержания аэроионов в воздухе на рабочих местах.

* Под санитарно-эпидемиологическими целями следует понимать нормализацию аэроионного состава воздуха, очистку воздушной среды и (или) профилактику заболеваний.

1.4. Указания предназначаются для лабораторий физических факторов центров госсанэпиднадзора и организаций всех видов организационно-правовых форм и форм собственности, индивидуальных предпринимателей и граждан, включая производителей и пользователей аэроионизирующего оборудования.

1.5. С введением в действие указаний утрачивают силу «Указания по компенсации аэроионной недостаточности в помещениях промышленных предприятий и эксплуатации аэроионизаторов» № 1601—77 от 14.02.77, п. 4.10 руководства Р 2.2.755—99 «Гигиена труда. Гигиенические критерии оценки и классификация условий труда по показателям вредности и опасности факторов производственной среды, тяжести и напряженности трудового процесса» и письмо заместителя Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 03.07.00 № 1100/1867—0—110 «О контроле аэроионного фактора в производственных и общественных помещениях».

2. Общие требования к проведению санитарно-эпидемиологической оценки

2.1. Санитарно-эпидемиологическая оценка аэроионизирующего оборудования производится путем контроля его гигиенических показателей. Контроль гигиенических показателей аэроионизирующего оборудования следует производить в соответствии с:

- настоящими Указаниями;
- утвержденными Минздравом России методиками контроля;
- техническими условиями (включающими руководства по эксплуатации) на оцениваемый тип аэроионизирующего оборудования, разработка которых должна осуществляться индивидуально для каждого типа аэроионизирующего оборудования с учетом его характерных особенностей, при участии одного из профильных научно-практических и консультационно-методических учреждений по вопросам, связанным с аэроионным фактором и организацией контроля гигиенических показателей оборудования для его нормализации.

2.2. Разделы технических условий, касающиеся контроля гигиенических показателей аэроионизирующего оборудования, могут быть пересмотрены с учетом изменения требований нормативных документов и подлежат корректировке при переоформлении санитарно-эпидемиологического заключения на данный тип аэроионизирующего оборудования.

2.3. Санитарно-эпидемиологическую оценку аэроионизирующего оборудования следует производить:

- в полном объеме – при проведении типовых испытаний и при оформлении (переоформлении) санитарно-эпидемиологического заключения;
- в сокращенном объеме – при вводе в эксплуатацию и при проведении периодического контроля гигиенических показателей условий труда на рабочих местах, где оно эксплуатируется.

2.4. В процессе эксплуатации аэроионизаторов, электростатических фильтров и деионизаторов, предназначенных для использования в санитарно-эпидемиологических целях, периодический контроль их гигиенических показателей допускается производить в ходе проведения периодического контроля условий труда на рабочих местах.

2.5. При несоответствии значений контролируемых гигиенических показателей, полученных в результате проведения санитарно-эпидемиологической оценки работы аэроионизирующего оборудования, нормируемым величинам, эксплуатация (дальнейшая эксплуатация) данного аэроионизирующего оборудования не допускается и оформление (переоформление) санитарно-эпидемиологического заключения на него не производится.

2.6. Основные гигиенические показатели, на соответствие которым производится санитарно-эпидемиологическая оценка аэроионизирующего оборудования указаны в табл. 1. Для отдельных типов аэроионизирующего оборудования, исходя из их индивидуальных особенностей, может быть установлена необходимость их дополнительной санитарно-эпидемиологической оценки на соответствие другим гигиеническим показателям.

Знаком «+» отмечена необходимость проведения контроля данного гигиенического показателя при проведении санитарно-эпидемиологической оценки в полном объеме, знаком «*» – при проведении санитарно-эпидемиологической оценки в сокращенном объеме.

2.7. Контроль гигиенических показателей аэроионизирующего оборудования (кроме галокамер, спелеоклиматических камер и карстовых пещер) следует осуществлять по прошествии времени его выхода на рабочий режим в соответствии с руководством по эксплуатации.

2.8. При санитарно-эпидемиологической оценке аэроионизаторов, гидроаэроионизаторов, галогенераторов, электростатических фильтров и деионизаторов, на которых все контролируемые гигиенические показатели удовлетворяют требованиям действующих нормативов, следует определять зону их действия – расстояния минимального и максимального удаления от пользователей.

2.9. Контроль гигиенических показателей аэроионизаторов (или иного аэроионизирующего оборудования) направленного действия следует осуществлять со стороны (на пути) преимущественного распространения потока аэроионов (или аэрозоли).

Таблица 1

Основные гигиенические показатели		Электрические аэроизаторы	Радионуклидные аэроионизаторы	Гидроаэроионизаторы	Галокамеры и спелеоклиматические камеры	Галогенераторы	Карстовые пещеры	Электростатические фильтры	Деионизаторы
1		2	3	4	5	6	7	8	9
Концентрации аэроионов, ρ (ион/см^3)	ρ^+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *
	ρ^-	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *
Коэффициент униполярности, У		+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *		+ *
Производительность (мг/ч)						+ *		+ *	
Количество микроорганизмов (КОЕ/см^3)					+		+		
Количество аэрозольных частиц соли, NaCl в 1 дм^3 с диаметром:	$<5 \cdot 10^{-6}$ см				+	+			
	$>5 \cdot 10^{-6}$ см				+ *	+ *			

Продолжение табл. 1

1		2	3	4	5	6	7	8	9
Концентрации веществ, ($мг/м^3$)	углекислого газа, CO_2				+		+		
	аммиака, NH_4				+		+		
	соли, NaCl				+*	+*			
	озона, O_3	+		+				+	+
	оксидов азота, NO_x в пересчете на NO_2	+		+				+	+
	аэрозоли				+ *		+ *		
Уровни	температуры воздуха				+		+		
	относительной влажности воздуха			+		+	+		
	ионизирующих излучений		+ *		+		+	*	
	звука	+		+		+		+	+
	вибрации	+		+		+		+	+
	электромагнитных излучений	+		+		+		+	+

2.10. Контроль концентраций аэроионов, образующихся в результате эксплуатации аэроионизаторов и деионизаторов, следует проводить в помещениях, запыленность воздушной среды которых не превышает 2 $мг/м^3$, при отсутствии электромагнитных полей и при оптимальных значениях параметров микроклимата.

2.11. Контроль концентраций аэроионов, производимых аэроионизаторами, предназначенными для нормализации аэроионного состава воздуха в условиях работы оборудования, способного создавать электростатические поля (включая видеодисплейные терминалы и оргтехнику), следует осуществлять при искусственно заданных параметрах электромагнитных излучений (согласно техническим условиям на аэроионизатор).

2.12. Контроль гигиенических показателей галокамер и спелеоклиматических камер следует осуществлять внутри них на расстоянии 0,8 м от каждой из их стен и на высоте 0,5 м от их пола в присутствии расчетного количества людей (согласно техническим условиям на оцениваемый тип) за 10 мин до окончания сеанса. Показатели микроклимата для галокамер должны находиться в пределах оптимальных значений.

2.13. Контроль гигиенических показателей галогенераторов следует осуществлять при их работе в помещениях с объемом, на работу в котором они рассчитаны (согласно техническим условиям на оцениваемый тип), в предполагаемых зонах дыхания людей.

2.14. Контроль гигиенических показателей карстовых пещер следует осуществлять в присутствии расчетного количества людей непосредственно во время сеанса в зонах их дыхания.

2.15. Контроль гигиенических показателей электростатических фильтров следует осуществлять на расстоянии минимального удаления, равном 0,2 м от их корпуса с каждой из сторон.

Контроль производительности электростатических фильтров следует осуществлять при расчетной запыленности воздуха и в помещении заданного объема (согласно

техническим условиям на оцениваемый тип). Нормативы производительности электростатических фильтров должны указываться в технических условиях на них.

2.16. Контроль концентраций аэроионов при работе деионизаторов следует осуществлять при искусственно заданной концентрации аэроионов (согласно техническим условиям на оцениваемый деионизатор), при отсутствии электромагнитных полей и при оптимальных значениях микроклимата.

2.17. Контроль концентраций пыли, микроорганизмов, O_3, NO_x, CO_2, NH_4, NaCl, а также уровней температуры и относительной влажности воздуха, ионизирующих излучений, звука, вибрации и электромагнитных излучений следует производить путем контроля их среднесменных значений (для галокамер и галогенераторов – максимальных разовых значений).

2.18. Правила проведения контроля производительности аэроионизирующего оборудования и уровней ионизирующих и электромагнитных излучений (табл. 1) определяются индивидуально для каждого типа аэроионизирующего оборудования техническими условиями на него.

3. Общие требования к эксплуатации

3.1. Содержание аэрозоля в воздухе помещений, где осуществляется эксплуатация аэроионизаторов в санитарно-эпидемиологических целях, не должно превышать 2 мг/м^3.

Аналогичные требования следует предъявлять к воздуху галокамер, спелеоклиматических камер и карстовых пещер, а также к воздуху помещений, где эксплуатируются гидроаэроионизаторы, или при работе галогенераторов (включая генерируемые ими частицы соли).

3.2. В помещениях жилищно-бытового назначения эксплуатация аэроионизирующего оборудования любых видов не рекомендуется, за исключением аэроионизирующего оборудования, предназначенного для использования в лечебных целях и допущенного к эксплуатации в данных помещениях в соответствии с методиками его применения.

3.3. Эксплуатация аэроионизирующего оборудования* должна соответствовать его назначению и руководству по эксплуатации.

3.4. Назначение аэроионизирующего оборудования зависит от его особенностей (видов) и определяется по табл. 2.

Таблица 2

№ п/п	Виды аэроионизирующего оборудования	Назначение (виды допустимого использования)
1	2	3
1	Униполярные аэроионизаторы индивидуального пользования направленного действия (средства индивидуальной защиты от аэроионной недостаточности)	Для использования в любых помещениях (включая жилые), на рабочих местах, оснащенных оборудованием, способным создавать электростатические поля, включая видеодисплейные терминалы и оргтехнику, в санитарно-эпидемиологических целях (для нормализации аэроионного состава воздуха и профилактики заболеваний) или для использования в лечебных целях

* В санитарно-эпидемиологических целях следует использовать только аэроионизирующее оборудование, относящееся к продукции производственно-технического назначения; в лечебных целях – только аэроионизирующее оборудование, относящееся к медицинским изделиям.

Продолжение табл. 2

1	2	3
2	Униполярные аэроионизаторы коллективного и индивидуального пользования рассеянного действия и коллективного пользования направленного действия (включая «люстры Чижевского»)	Для использования в лечебных целях
3	Биполярные аэроионизаторы индивидуального пользования направленного действия	Для использования в любых помещениях, на рабочих местах, кроме помещений, где имеются рабочие места, оснащенные оборудованием, способным создавать электростатические поля, включая видеодисплейные терминалы и оргтехнику в санитарно-эпидемиологических целях (для нормализации аэроионного состава воздуха и профилактики заболеваний) или для использования в лечебных целях
4	Биполярные аэроионизаторы коллективного пользования рассеянного и направленного действия и индивидуального пользования рассеянного действия	Для использования в гермозамкнутых помещениях с искусственной средой обитания и (или) в помещениях, оснащенных системами (включая централизованные) принудительной вентиляции, очистки и (или) кондиционирования воздуха, кроме помещений, где имеются рабочие места, оснащенные оборудованием, способным создавать электростатические поля, включая видеодисплейные терминалы и оргтехнику, в санитарно-эпидемиологических целях (для нормализации аэроионного состава воздуха и профилактики заболеваний) или для использования в лечебных целях
5	Гидроаэроионизаторы и галогенераторы	Для использования в лечебных целях
6	Галокамеры, спелеоклиматические камеры и карстовые пещеры	Для использования в санитарно-эпидемиологических (для профилактики заболеваний) и лечебных целях
7	Электростатические фильтры	Для использования в любых помещениях в санитарно-эпидемиологических целях (для очистки воздушной среды)
8	Деионизаторы	Для использования в любых помещениях в санитарно-эпидемиологических целях (для нормализации аэроионного состава воздуха)

3.5. В руководствах по эксплуатации (или паспортах) на аэроионизирующее оборудование, предназначенное для использования в санитарно-эпидемиологических целях, следует указывать его назначение (табл. 2 указаний), а для аэроионизирующего оборудования, предназначенного к использованию в лечебных целях, – полное содержание разрабатываемой и утверждаемой в порядке, установленном для медицинских изделий, методики его применения.

3.6. Использование радионуклидных аэроионизаторов допускается только в помещениях, где технологические особенности производств не допускают применения электрических аэроионизаторов. Назначение радионуклидных аэроионизаторов различных видов аналогично назначению электрических аэроионизаторов тех же видов.

3.7. В целях очистки воздушной среды помещений в присутствии людей следует использовать электростатические фильтры, производящие очистку проходящего внутри их корпусов воздушного потока и не влияющие на аэроионный состав воздуха помещений.

Электростатические фильтры, производящие очистку воздуха путем придания электрического заряда аэрозолям, находящимся во всем объеме воздушной среды помещений и влияющие на аэроионный состав воздуха в них, допускается использовать только при отсутствии людей в данных помещениях.

3.8. К эксплуатации допускается аэроионизирующее оборудование, прошедшее санитарно-эпидемиологическую оценку в объеме и порядке, предусмотренных настоящими указаниями, все контролируемые гигиенические показатели которого находятся в пределах, установленных действующими гигиеническими нормативами (для аэроионизирующего оборудования, предназначенного для использования в лечебных целях – медико-техническими требованиями), на которое оформлено санитарно-эпидемиологическое заключение и иные предусмотренные действующим законодательством Российской Федерации документы.

3.9. Оформление (переоформление) санитарно-эпидемиологического заключения на аэроионизирующее оборудование, предназначенное для использования в лечебных целях, следует производить в порядке, предусмотренном настоящими указаниями.

3.10. Оформление (переоформление) санитарно-эпидемиологического заключения на аэроионизирующее оборудование, предназначенное для использования в санитарно-эпидемиологических целях, следует производить по завершении разработки либо пересмотра технических условий на него и по проведении его санитарно-эпидемиологической оценки.

3.11. Оформление санитарно-эпидемиологического заключения на галокамеры, спелеоклиматические камеры и карстовые пещеры следует производить при их вводе в эксплуатацию и переоформлять, по истечении срока его действия, в процессе их эксплуатации.

3.12. Оформление санитарно-эпидемиологического заключения на аэроионизаторы, гидроаэроионизаторы, галогенераторы, электростатические фильтры и деионизаторы следует производить при освоении их производства и переоформлять, по истечении срока его действия, в процессе их производства. Оформление (переоформление) санитарно-эпидемиологического заключения на данные виды аэроионизирующего оборудования в процессе их эксплуатации не требуется. При совместном использовании галокамер с галогенераторами санитарно-эпидемиологическое заключение следует оформлять в порядке, предусмотренном для галокамер по проведении санитарно-эпидемиологической оценки совместной работы каждого из них (табл. 1 указаний).

Приложение 1
(рекомендуемое)

Оборудование для контроля и нормализации аэроионного состава воздуха

*1. Счетчики аэроионов**

Наименование, № технических условий, № Госреестра	Диапазон измерений, ион/см^3	Питание прибора	Масса, кг	Габариты, мм	Дополнительные возможности
Счетчик аэроионов малогабаритный «МАС-01» ТУ 6361-001-18446736—00; государственный Реестр средств измерений № 20429—00	10^2—10^6	Автономное электропитание, аккумуляторная сборка 6 х 1,2 В	0,9	190 × 105 × 65	Автообработка и автоусреднение результатов измерений микропроцессором, пленочная клавиатура, ударопрочный корпус

*2. Аэроионизаторы***

Наименование и № технических условий	Питание	Масса, кг	Габариты, мм	Примечания
Аэроионизатор стабилизирующий «Москва СА-1» униполярный (n^-) индивидуального пользования направленного действия ТУ 51-56-001-17507588—95	220 В, 50 Гц	1,2	230 × 170 × 280	в виде настольной лампы
		1,2	230 × 100 × 1 200	на кронштейне с регулировкой высоты
		0,6	250 × 100 × 200	на прищепке-подвеске
Аэроионизаторы серии «Москва» ТУ 480К «ЭФ»-919/17-2-80—91	220 В, 50 Гц	от 0,8		по заказу

* Допускается использование других типов внесенных в Государственный реестр средств измерений счетчиков аэроионов.

** Допускается использование аэроионизаторов других типов, если они допущены к эксплуатации в соответствии с настоящими указаниями.

Приложение 2

Термины и определения

Применительно к настоящим указаниям приняты следующие термины и определения.

1. *Тяжелые ионы* – ионы, носителями заряда которых является аэрозоль.

2. *Аэрозоль* – дисперсная система с газообразной средой и твердой (пыль, микроорганизмы) или жидкой дисперсной фазой.

3. *Аэроионизирующее оборудование* – аэроионизаторы, гидроаэроионизаторы, галогенераторы, галокамеры, спелеоклиматические камеры, карстовые пещеры, электростатические фильтры и деионизаторы всех видов.

4. *Биполярный аэроионизатор* – аэроионизатор, генерирующий аэроионы отрицательной и положительной полярности.

5. *Униполярный аэроионизатор* – аэроионизатор, генерирующий аэроионы только одной полярности (отрицательной, n^-).

6. *Электрический аэроионизатор* – аэроионизатор, принцип действия которого основан на истечении электрического заряда с электродов в сильном электрическом поле (включая «люстры Чижевского»).

7. *Радионуклидный аэроионизатор* – аэроионизатор, принцип действия которого основан на воздействии ионизирующего излучения на воздушную среду.

8. *Аэроионизатор направленного действия* – аэроионизатор, способный к созданию ориентированного в определенном направлении потока аэроионов (без использования вентилятора), распространяющегося на расстояние не менее 2 м.

9. *Аэроионизатор рассеянного действия* – аэроионизатор, генерирующий аэроионы без образования направленного потока (включая оснащенный вентилятором).

10. *Аэроионизатор (или деионизатор) индивидуального пользования* – аэроионизатор или деионизатор, использование которого позволяет осуществлять нормализацию аэроионного состава воздуха не более чем на трех рабочих местах, находящихся на расстоянии до 0,5 м друг от друга, одновременно.

11. *Аэроионизатор (или деионизатор) коллективного пользования* – аэроионизатор или деионизатор, использование которого позволяет осуществлять нормализацию аэроионного состава воздуха более чем на трех рабочих местах, находящихся в одном помещении, одновременно.

12. *Гидроаэроионизатор (или аэрофитогенератор)* – устройство, предназначенное для искусственного создания гидроаэроионов (аэроионов, образованных аэрозолями с жидкой дисперсной фазой, включая лекарственные).

13. *Галогенератор* – устройство, предназначенное для искусственного создания аэрозолей солей.

14. *Галокамера (или спелеоклиматическая камера)* – помещение, полностью или частично облицованное внутри солью.

15. *Карстовая пещера* – известняковая пещера естественного происхождения

16. *Электростатический фильтр* – воздушный фильтр, принцип действия которого основан на придании электрического заряда аэрозолю, его осаждению и сбору путем использования его электрического заряда.

17. *Деионизатор* – устройство, предназначенное для снижения концентрации аэроионов путем искусственного лишения носителя его электрического заряда.

18. *Счетчик аэроионов* – средство измерения концентраций аэроионов.

Библиографические данные

1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52-ФЗ от 30.03.99.

2. «Гигиенические требования к аэроионному составу воздуха производственных и общественных помещений» СанПиН 2.2.4.1294—03.

3. «Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны» ГН 2.2.5.1313—03.

4. «Нормы радиационной безопасности» СП 2.6.1.758—99.

5. «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности» СП 2.6.1.799—99.

6. «Общие требования к проведению контроля аэроионного состава воздуха» МУК 4.3.1675—03.

7. «Система стандартов безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация» ГОСТ 12.0.003—74.

8. «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны» ГОСТ 12.1.005—88.

9. «Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности» ГОСТ 12.2.007.0—75.

10. «Система разработки и постановки продукции на производство. Продукция производственно-технического назначения» ГОСТ 15.001—88.

11. «Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия» ГОСТ Р 15.013—94.

12. «Применение медтехнологий галотерапии в комплексном лечении и реабилитации заболеваний органов дыхания» МР МЗ РФ № 95/111—95.

13. «Лечение в спелеоклиматической камере из натуральных калийно-магниевых солей верхнекамского месторождения» МР МЗ РФ от 28.04.94.

14. «О контроле и коррекции аэроионного фактора при аттестации рабочих мест» Письмо заместителя Главного государственного санитарного врача РФ от 05.12.00 № 19ФЦ/4176.

15. «О контроле аэроионного фактора в производственных и общественных помещениях» Письмо Минтруда РФ от 18.07.00 № 647—8.

gost.e-ecolog.ru