

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель

Министра здравоохранения -

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь

 Н.П. Жукова

«30» 08 2016 г.

Регистрационный № 001-016

**ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *LISTERIA*
MONOCYTOGENES В ОБЪЕКТАХ СРЕДЫ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
ОКРУЖЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Государственное учреждение «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии».

Авторы: к.м.н., доцент Тонко О.В., к.м.н., доцент Федоренко Е.В., д.м.н., профессор Коломиец Н.Д., к.б.н., доцент Дудчик Н.В., к.м.н. Ханенко О.Н., Левшина Н.Н., Филипенко С.С., Марейко А.М.

Минск, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н.П. Жукова
30.08 2016
Регистрационный № 001-0116

**ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ
LISTERIA MONOCYTOGENES В ОБЪЕКТАХ СРЕДЫ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОКРУЖЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», РУП «Научно-практический центр гигиены», ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. О.В. Тонко, канд. мед. наук, доц. Е.В. Федоренко, д-р мед. наук, проф. Н.Д. Коломиец, к.б.н., доц. Н.В. Дудчик, канд. мед. наук О.Н. Ханенко, Н.Н. Левшина, С.С. Филипенко, А.М. Марейко

Минск 2016

ГЛАВА 1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая инструкция по применению «Выявление и идентификация бактерий *Listeria monocytogenes* в объектах среды технологического окружения пищевых производств» (далее — инструкция) устанавливает метод выявления бактерий *Listeria monocytogenes* с поверхностей, контактирующих с пищевой продукцией при ее производстве, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний, связанных с пищевым путем передачи.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, иных специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, и иных организаций, проводящих бактериологические исследования с целью выявления бактерий *Listeria monocytogenes*.

ГЛАВА 2. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

1. При выполнении испытаний в лаборатории следует руководствоваться общими требованиями и рекомендациями согласно ГОСТ ISO 7218.

2. В помещениях для проведения исследований должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха при выполнении измерений (18–27)°С;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25°С.

ГЛАВА 3. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Для выявления бактерий *Listeria monocytogenes* с поверхностей, контактирующих с пищевой продукцией при ее производстве, используются медицинские изделия, оборудование, лабораторная посуда и материалы:

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений $pH \pm 0,1$ (рН-метр)	ГОСТ 19881-74
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру (45±1)°С	ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные	ГОСТ 24104-2001
Дистиллятор электрический	
Лупа с пятикратным увеличением	ГОСТ 25706-83
Стерилизатор паровой с рабочим давлением пара не более 0,22 МПа (2,2 кгс/см ²)	
Стерилизатор суховоздушный	для

температурного режима (180±5)°С	
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100°С с ценой деления шкалы 1°С	ГОСТ 24498-90
Термостат электрический суховоздушный, ±1°С	
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317-87
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83
Вата медицинская	ГОСТ 5556-81
гигроскопичная	
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 25336-82
Системы для взятия смывов (зонд-тампон, губка)	ТУ 8195-012-44881728-2011
Ножницы	ГОСТ 21241-89
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	ГОСТ 25336-82
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90Е
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932-90Е
Штативы для пробирок	
Перчатки медицинские стерильные	
Автоматические дозаторы с переменным объемом дозирования (от 5 до 20 мм ³ с шагом 0,01 мм ³ , с точностью ±0,8% и от 20 до 200 мм ³ с шагом 0,1 мм ³ , с точностью ±0,6%)	
Аппарат для встряхивания пробирок, скорость вращения 250–3000 мин ⁻¹	
Аппарат универсальный для встряхивания жидкости в колбах и пробирках (или другая аппаратура для встряхивания)	
Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) или ламинарный шкаф класса биологической безопасности II, тип А	
Вакуумный отсасыватель	

медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости

Компьютер, совместимый с программным обеспечением амплификатора/детектора, в комплекте с монитором, клавиатурой, мышью, кабелем, компакт-дисками с информацией по эксплуатации и инструкциями по настройке прибора

Микроцентрифуга настольная типа эппендорф (частота вращения не менее 13000 мин⁻¹)

Облучатель бактерицидный настенный

Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой не выше -16°C для хранения выделенных проб ДНК

Центрифуга, обеспечивающая 20000xg

Часы механические сигнальные При детекции FRT — в режиме реального времени:

программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени

одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР в режиме реального времени:

- на 0,2 см³ (плоская крышка, нестрипованные, для постановки в ротор на 36 пробирок) — для приборов с детекцией через дно пробирки

- на 0,2 см³ (куполообразная крышка, для приборов с детекцией через крышку)

Контейнер для сброса наконечников

Контейнеры стерильные из полимерных материалов с крышками для отбора образцов

Наконечники одноразовые с фильтром для дозаторов с

ГОСТ 26678-85

ГОСТ 3145-84

переменным объемом дозирования от 5 до 20; от 20 до 200; от 200 до 1000 мм³; до 10 см³

Ножницы медицинские

ГОСТ 21239-89

Одноразовые халаты, шапочки, маски, обувь или бахилы, одноразовые перчатки резиновые или латексные неопудренные

Оптически прозрачные крышки для ПЦР-пробирок

Стандарт-титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии

ГОСТ 8.135-2004 ГСИ

Реагенты для проведения ПЦР

Комплект реагентов (набор) для выделения

ДНК из исследуемого материала

ТУ 9398-003-01897593-2009 или аналогичный по техническим

Комплект реагентов (набор) для выделения ДНК/РНК из исследуемого материала

ТУ 9398-071-01897593-2008 или аналогичный по техническим

Комплекты реагентов (наборы) для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, обеспечивающие аналитическую чувствительность на уровне 1×10^3 ГЭ/см³ в отношении выявляемых фрагментов ДНК

характеристикам
ФС 42-186ВС-88

Listeria monocytogenes, содержащие:

- смеси олигонуклеотидных праймеров на участки ДНК бактерий и флуоресцентномеченных олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам амплифицируемых ДНК-мишеней;

- полимеразу (TaqF);

- смесь буфера и нуклеозидтрифосфатов;

- ДНК-буфер;

- положительные контрольные образцы этапа ПЦР со специфическими фрагментами ДНК

искомых микроорганизмов и внутренним контрольным образцом;

- отрицательный контрольный образец и внутренний неконкурентный контрольный образец этапа выделения;

минеральное масло для ПЦР
силика магнитная в растворе для автоматизированной экстракции ДНК;

- буфер лизирующий для автоматизированной экстракции ДНК;

- буфер для экстракции 1 для автоматизированной экстракции ДНК;

- буфер для экстракции 2 для автоматизированной экстракции ДНК;

- буфер для экстракции 3 для автоматизированной экстракции ДНК.

2. Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000; питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

ГЛАВА 4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

1. Для приготовления растворов реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации «х.ч.» или «ч.д.а.».

2. Необходимое значение водородного показателя рН (далее — рН) растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроокиси натрия массовой концентрацией 0,1 моль/дм³ или раствора кислоты соляной объемной долей 0,1 моль/дм³; рН растворов и питательных сред определяют с помощью рН-метра. Ориентировочное определение рН растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги.

3. *Среды для взятия смывов.* В легкодоступных точках отбора проб, которые берутся в процессе производства продуктов, для увлажнения основания тампона и взятия смывов с оборудования должны быть использованы среды для взятия смывов, не содержащие нейтрализатор.

Рекомендуемые среды: пептонная вода в концентрации от 1 г/л, физиологический раствор пептона или раствор Рингера, разлитые в пробирки или флаконы и простерилизованные в течение 15 мин при температуре 121°C.

Фосфатный буферный раствор применять не рекомендуется.

Бульон Фразера не следует использовать вместо сред для взятия смывов, так как он может способствовать росту *Listeria monocytogenes* в месте обработки.

В любых точках отбора, где возможны остаточные количества дезинфицирующих средств, или когда пробы отбирают сразу после дезинфекции, следует использовать нейтрализующие среды для увлажнения основания тампона и взятия смывов с оборудования.

Для нейтрализации остаточного количества дезинфицирующих средств используется нейтрализующий бульон с компонентами:

- полисорбат 80 (30 г/л);
- лецитин (3 г/л);
- тиосульфат натрия (5 г/л);
- L-гистидин (1 г/л);
- сапонин (30 г/л);
- пептон (1 г/л);
- хлорид натрия (8,5 г/л).

Нейтрализатор разливается во флаконы и стерилизуется в течение 15 мин при 121°C.

4. *Селективные среды первичного обогащения.* Для первичного обогащения используется полуконцентрированный бульон Фразера. Исследуемую пробу X (см³ или г) вносят в среду, исходя из соотношения пробы и среды 1:9. Приготовление сред проводится в соответствии с ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*».

ГЛАВА 5. ВЫБОР ТОЧЕК ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ

1. Отбор проб осуществляется с поверхностей, контактирующих с пищевой продукцией при ее производстве, где пищевой продукт подвергается риску загрязнения.

Отбор проб может осуществляться с поверхностей, не контактирующих с готовой пищевой продукцией, с целью изучения циркуляции патогенных микроорганизмов на производстве.

Выбор места отбора проб проводится каждым предприятием после исследования особенностей технологического процесса и анализа предшествующих данных о мониторинге циркуляции патогенных микроорганизмов на производстве.

2. Примерный перечень мест для отбора проб:

- поверхности, не контактирующие с пищевыми продуктами: водостоки, полы, бассейны воды на полу, чистящие инструменты, моечные, весовое оборудование в пол, шланги, полые ролики для конвейеров, конвейеры, рамочное оборудование, внутренняя панель оборудования, капли конденсата, вилочные погрузчики, ручные тележки, тележки, колеса тележек, мусорные баки, морозильные камеры, льдогенераторы, охлаждающие пластины в конденсаторах, фартуки, стены, потолки, холодные места, где вода конденсируется как влага на стенах или вокруг труб и охлаждающих устройств, резиновые уплотнители вокруг дверей, особенно в охладителях (кулерах), содержимое пылесосов, дверные ручки и краны;

- поверхности, контактирующие с пищевыми продуктами: столы, ленты конвейера, ножи, разделочные доски, измельчители, блендеры, оборудование для розлива и упаковки, контейнеры, емкости, ванны, тележки, внутренняя поверхность трубопроводов, краны и другие выпускные отверстия, руки работников, другие предметы, например, многоразовые перчатки.

ГЛАВА 6. ПЛОЩАДЬ, ПОДЛЕЖАЩАЯ ОТБОРУ

1. Для поверхностей, контактирующих с готовыми к употреблению пищевыми продуктами, площадь смыва составляет не менее 500 см² (в целом) и не менее 5 объектов (ножи, краны, емкости, руки работников и объекты, непосредственно контактирующие с готовыми к употреблению пищевыми продуктами или руками работников в процессе производства пищевых продуктов).

Для определения патогенных микроорганизмов с целью мониторинга циркуляции *Listeria monocytogenes* рекомендуется исследовать площадь от 1000 до 3000 см².

2. Зонд-тампон следует использовать для отбора проб в труднодоступных и небольших участках (например, внутри полых роликов, корпуса двигателя).

3. Губки следует использовать для отбора проб с больших площадей. В сравнении с зонд-тампонами губками можно более энергично протереть поверхности, и они имеют лучшую поглощающую способность.

4. Не рекомендуется использовать многоразовые шаблоны или другие специальные приспособления, поскольку они могут быть источниками контаминации и (или) их дезинфекция может помешать испытанию. Однако площадь, подлежащая отбору, должна быть известна, так, можно учитывать, что длина предплечья, от кончика среднего пальца до локтя, составляет около 45 см, а расстояние между кончиком большого пальца и мизинцем — примерно 20 см, когда пальцы расправлены.

Размер площади, подлежащей отбору, должен быть постоянным для того, чтобы можно было оценивать тенденции результатов мониторинга в динамике.

ГЛАВА 7. ПОДГОТОВКА МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ОБОРУДОВАНИЯ, ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ, МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ

1. Медицинские изделия, оборудование, лабораторная посуда и материалы микробиологической лаборатории не следует использовать в помещениях пищевых производств из-за рисков, связанных с возможной контаминацией.

Медицинские изделия, оборудование, лабораторная посуда и материалы для отбора проб с поверхностей должны храниться и обрабатываться отдельно от других лабораторных работ, особенно если в лаборатории проводят исследования на патогенную группу микроорганизмов.

2. Ни один из расходных элементов, используемых для отбора проб, не должен остаться в производственной зоне. С этой целью рекомендуется считать эти расходные элементы до и после отбора проб.

3. Система для взятия смывов в виде зонд-тампона (далее — зонд-тампон) используется сухой или увлажненной.

В том случае, если поверхность отбора влажная, следует использовать сухой зонд-тампон.

В том случае, если поверхность сухая, должен использоваться увлажненный зонд-тампон.

Если смыв должен быть сделан во влажном или сухом месте, где возможны остаточные количества дезинфицирующих средств (чаще в труднодоступных местах), тампон должен быть увлажнен с помощью нейтрализующего бульона, обозначенного в п. 9 настоящей инструкции.

Увлажненные тампоны могут быть приготовлены в асептических условиях в лаборатории до начала проведения отбора образцов. Конец тампона должен слегка коснуться среды для взятия смывов, обозначенных в п. 9 настоящей Инструкции, таким образом, чтобы с тампона не стекали капли влаги. Затем тампон помещают обратно в пробирку, которая плотно закрывается так, чтобы обеспечить стерильность и поддерживать влажность.

4. Увлажненные системы для взятия смывов в виде губки (далее — губка) могут быть приготовлены в асептических условиях в лаборатории до начала отбора образцов с соответствующим и записанным объемом среды для взятия смывов, обозначенных в п. 9 настоящей инструкции, таким образом, чтобы не стекали капли влаги. После увлажнения системы для взятия смывов закрываются в пластиковый пакет таким образом, чтобы обеспечить стерильность и поддерживать влажность.

Если увлажнение губки выполняется в условиях пищевого производства, среда для взятия смывов не должна храниться в стеклянной бутылке.

ГЛАВА 8. МЕТОД ВЗЯТИЯ СМЫВОВ

Метод взятия смывов с использованием зонд-тампона.

1. Достают зонд-тампон из пробирки.

2. Перемещают зонд-тампон в нескольких направлениях по поверхности или внутренней стороне частей оборудования или в ином труднодоступном месте для отбора проб с усилием, достаточным для полного смачивания исследуемой поверхности или предмета, но не приводящим к разрушению зонд-тампона.

3. Помещают зонд-тампон в пробирку.

4. Закрывают пробирку так, чтобы зонд-тампон был защищен от загрязнения и его конец оставался влажным до проведения анализа.

5. После отбора проб поверхность, с которой отбирались смывы зонд-тампоном, обрабатывают дезинфицирующим средством, разрешенным к применению в установленном порядке, с последующей промывкой поверхности водой и протиранием чистой салфеткой.

Метод взятия смывов с использованием губки.

6. Удаляют избыточную жидкость с поверхности, с которой будет отобран смыв (в случае, если поверхность слишком мокрая), осторожным наложением стерильной поглощающей бумаги.

7. Открывают пластиковый пакет, содержащий губку.

8. Достают губку с соблюдением правил асептики (например, используют стерильные перчатки). В качестве альтернативы губка может быть захвачена через пластиковый пакет, если потянуть за перевернутый пакет рукой.

9. Протирают всю выбранную поверхность энергичным зигзагообразным движением в двух перпендикулярных направлениях, меняя стороны губки.

10. Возвращают губку в пластиковый пакет.

11. Закрывают пластиковый пакет так, чтобы губка была защищена от загрязнения и сохранилась влажной до проведения анализа.

12. После отбора проб поверхность, с которой отбирались смывы губкой, обрабатывают дезинфицирующим средством, разрешенным к применению в установленном порядке, с последующей промывкой поверхности водой и протиранием чистой салфеткой.

13. Места отбора проб должны быть указаны в протоколе исследования.

ГЛАВА 9. ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ СМЫВОВ

1. Транспортировка смывов осуществляется в сумках-холодильниках.

2. При необходимости допускается хранить смывы в лаборатории при температуре $(3 \pm 2)^\circ\text{C}$. Приступить к проведению анализа необходимо как можно быстрее, но не позднее чем через 24 ч после поступления проб в лабораторию.

3. Продолжительность времени до начала анализа должна быть указана в протоколе исследования.

ГЛАВА 10. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

При использовании зонд-тампона.

1. Добавить достаточный объем (в соответствии с п. 10, но не менее 9 мл) полуконцентрированного бульона Фразера в пробирку с зонд-тампоном так, чтобы конец тампона полностью был погружен в бульон.

2. Тщательно перемешать содержимое пробирки, содержащей зонд-тампон, лучше с помощью смесителя для смешивания жидкостей в пробирке в течение 30 с.

При использовании губки

3. Добавить в пластиковый пакет, содержащий губку, полуконцентрированный бульон Фразера в объеме, в 9 раз превышающем объем от взятого для увлажнения губки. Губка должна полностью впитать бульон.

4. Содержимое пластикового пакета обработать в смесителе для смешивания жидкостей в течение 1 мин.

5. Выявление и идентификация *Listeria monocytogenes* культуральным методом выполняются в соответствии с ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*».

6. Выявление и идентификация *Listeria monocytogenes* молекулярно-генетическим методом выполняются в соответствии с инструкцией по применению № 009-1113 «Молекулярно-генетические методы определения условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в продовольственном сырье и пищевых продуктах», утвержденной 23.12.2013 заместителем министра здравоохранения – главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Результаты оцениваются по каждому смыву отдельно.
2. Оценка соответствия результатов осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.