

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
23.12.2013
Регистрационный № 009-1113

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ И ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр
гигиены»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Н.В. Дудчик, Т.С. Трешкова, канд. мед. наук, доц.
Т.А. Канашкова, Л.Л. Ушкова, Т.В. Грищенко, В.В. Трейлиб, Т.О. Козлова,
С.А. Науменко

Минск 2014

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) распространяется на продовольственное сырье и пищевые продукты и определяет методы выявления и идентификации патогенных бактерий *Salmonella*, *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii*, энтерогеморрагических *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, а также *Listeria monocytogenes*.

2. Настоящая Инструкция по применению предназначена для врачей учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за безопасностью и безвредностью для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также специалистов иных организаций здравоохранения, выполняющих определение и оценку соответствующих микробиологических показателей.

ГЛАВА 2 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

3. Оборудование:

НД (ГОСТ, ТУ)

Автоматическая станция для экстракции ДНК в комплекте

Автоматические дозаторы с переменным объемом дозирования (от 5 до 20 мм³ с шагом 0,01 мм³, с точностью ±0,8% и от 20 до 200 мм³ с шагом 0,1 мм³, с точностью ±0,6%)

Анализатор потенциометрический с погрешностью измерений pH ±0,01 (pH-метр)

ГОСТ 19881-74

Анаэробный инкубатор или настольная система для анаэробного инкубирования

Аппарат для встряхивания пробирок, скорость вращения 250–3000 мин⁻¹

Аппарат универсальный для встряхивания жидкости в колбах и пробирках (или другая аппаратура для встряхивания)

Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру (37,0±1,0)°С

ГОСТ 12026-76

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

Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) или ламинарный шкаф класса биологической безопасности II тип А

Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой ловушкой для удаления надосадочной жидкости

Весы лабораторные общего назначения 2 и 4-го

ГОСТ 24104– 88

класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	
Гомогенизатор бактериологического перистальтического	
Денситометр для бактериальных суспензий	
Диспенсер	
Дистиллятор электрический	ГОСТ 6709-72
Компьютер, совмещаемый с программным обеспечением амплификатора/детектора, в комплекте с монитором, клавиатурой, мышью, кабелем, компакт-дисками с информацией по эксплуатации и инструкциями по настройке прибора	
Микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000*	ГОСТ 8284-78
Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее 13000 мин ⁻¹)	
Насос вакуумный (водоструйный)	
Прибор вакуумной мембранной фильтрации	
Облучатель бактерицидный настенный	
Распределительная емкость объемом 1-2,5 дм ³	
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569-89
Стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100,0–220,0)°С	ГОСТ 24437-89
Термометр (0–100,0)°С, цена деления 1,0°С	
Термостат для пробирок типа Эппендорф вместимостью 1,5 см ³ , диапазон температур от 15,0 до 120,0°С.	ГОСТ 24498– 90
Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до 50,0°С, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1,0°С	ТУ 64-1-1382-72
Холодильник от 2,0 до 8,0°С с морозильной камерой не выше -16,0°С для хранения выделенных проб ДНК	ГОСТ 26678-85
Центрифуга, обеспечивающая 20000*g	
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145-84
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83

При детекции FER — «по конечной точке»:

программируемый амплификатор флуоресцентный
 ПЦР-детектор
 одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР
 (плоская крышка, нестрипованные):

- а) объемом 0,2 см³ (для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 см³);
б) объемом 0,5 см³ (для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 см³)

При детекции FRT — в режиме «реального времени»:

программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»

одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР в реальном времени:

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

4. Материалы:

Банки стеклянные широкогорлые на 250 и 500 см³ с пробками (корковыми, ватно-марлевыми) или завинчивающимися крышками

Бумага пергаментная

Бумага фильтровальная лабораторная

Вата медицинская гигроскопичная

Воронки стеклянные

Колбы плоскодонные конические или круглые различной вместимости

Колбы стеклянные мерные плоскодонные вместимостью 25; 50; 100; 200; 1000 см³

Контейнер для сброса наконечников

Контейнеры стерильные из полимерных материалов с крышками для отбора образцов объемом не менее 100 мл

Ложки столовые стальные или одноразовые из полимерных материалов

Марля медицинская

Микропипетки на 100–1000 мм³ с шагом 5 мм³ с точностью ±0,5%

Набор отраслевых стандартных образцов для визуальной оценки мутности микробных взвесей ОСО 42-28-85-04П

Наконечники одноразовые с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования от

ГОСТ 12026-76

ГОСТ 5556-81

ГОСТ 25336-82

ГОСТ 25336-82

ГОСТ 12738-77

ГОСТ 9412-93

5 до 20; от 20 до 200; от 200 до 1000 мм ³ ; до 10 см ³	
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239-89
Одноразовые халаты, шапочки, маски, обувь или бахилы, одноразовые перчатки латексные неопудренные	
Оптически прозрачные крышки для ПЦР-пробирок	
Пакеты газогенераторные для микроаэробного инкубирования	
Пакеты стерильные одноразовые для гомогенизатора перистальтического типа	
Петли бактериологические	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241-89
Пипетки вместимостью 1; 2; 5 и 10 см ³	ГОСТ 29227-91
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	ГОСТ 25336-82
Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 см ³	
Пробирки стрипованные для автоматического экстрактора ДНК	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336-82
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240-89
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932- 90
Стандарты МакФарланда №№ 1–3	
Стекля предмтные для микропрепаратов	ГОСТ 9284-75
Стекля покровные	ГОСТ 6672-75
Ступки фарфоровые	ГОСТ 9147-80
Фильтры мембранные микроцеллюлозные № 3	
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные на 25–1000 см ³	ГОСТ 1770-74
Чашки биологические (Петри) стеклянные или одноразовые из полимерных материалов	ГОСТ 23932-90
Штативы для микропробирок объемом 0,2; 0,5 и 1,5 см ³ (или в соответствии с используемыми комплектами реагентов)	
Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100; 200; 500 см ³	ГОСТ 10782-85
Стандарт титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии	ГОСТ 8.135-2004 ГСИ
Штативы для микропробирок объемом 0,2; 0,5 и 1,5 см ³ (или в соответствии с используемыми комплектами реагентов)	
Шпатели стеклянные	
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336-82
Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 см ³	

5. Питательные среды, реактивы, дезсредства

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 патогенных бактерий *Enterobacter sakazakii*, энтерогеморрагических *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* и *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, содержащие:

ФС 42-186ВС-88

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

- полимеразу (TaqF);

- смесь буфера и нуклеозидтрифосфатов;

- ДНК-буфер;

- положительные контрольные образцы этапа ПЦР со специфическими фрагментами ДНК искомым 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,

Питательные среды для обогащения

микроорганизмов, приготовления
бактериальных взвесей и их компоненты:
Стерильный фосфатный буфер с рН 7,2±0,1 для
предварительного селективного обогащения
бактерий *Enterobacter sakazakii*

ГОСТ Р 52814-07
МУК 4.2.2428-08
ГОСТ 26669-85
ГОСТ 29184-91

Стерильный изотонический 0,85%-й водный
раствор хлорида натрия для предварительного
неселективного обогащения бактерий *Enterobacter
sakazakii*

VRBG-агар (агар с кристаллическим фиолетовым,
нейтральным красным, глюкозой и желчью)

Триптон соевый агар с дрожжевым экстрактом
(TSYEA-агар)

Среда Кесслер с глюкозой

Бульон Мак-Конки с глюкозой

Триптон-соевый бульон модифицированный

Мак-Конки агар с сорбитолом (ST-SMAC)

Глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым
и желчью

Среда Кесслер с лактозой

Лактозный бульон с бриллиантовым зеленым
и желчью

ГОСТ 30726-2001
ГОСТ Р 52816-07
МУК 4.2.992-00

Грам-негативный обогащающий бульон
(GN-бульон) по Хайну

Селенитовая среда жидкая в модификации
Лейфсона (селенитовый бульон), маннитный
селенитовый бульон

ГОСТ 29184-91

Мясо-пептонный бульон или МПА с 1% глюкозы,
МПБ с 1% глюкозы

Забуференная пептонная вода для
предварительного неселективного обогащения
бактерий рода *Salmonella*

Молоко сухое обезжиренное

Среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-
бульон)

Питательная среда для накопления сальмонелл,
сухая (селенитовый бульон)

Мюллер–Кауфман тетрационатный бульон (МКТ-
бульон),

Основа селективного бульона (Престона)

для накопления кампилобактерий

Основа селективного бульона (Дойла)

для накопления кампилобактерий

Кровь баранья дефибринированная стерильная

Аэротолерантная добавка на основе натрия пировинограднокислого, железа (II) сернокислого, натрия метабисульфита
Добавка антибиотиков для кампилобактерий-I (по Блэйзер–Вонг)
Добавка антибиотиков модифицированная III (по Дойлу)
Добавка антибиотиков для кампилобактерий-IV, (по Престону) модифицированная,
Бульон Болтона
Модифицированный агар с углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (mCCD-агар)
Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ),
Бульон Фрейзера для обогащения листерий,
Бульон Фрейзера для вторичного обогащения листерий
Кровяной агар
Лецитин агар
Солевой бульон
Желточно-солевой агар
Агар Байрд–Паркер
Эскулин,
Железа аммонийного цитрат,
Литий хлористый,
Налидиксовая кислота,
Гуанидина гидрохлорид,
Тритон X-100,
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота),
Трис-НСl,
Суспензия двуокиси кремния силикагель (SiO₂),
Ацетон,
Хлороформ водонасыщенный,
2-меркаптоэтанол, х.ч.
смесь газов 5% O₂, 15% CO₂ и 80% N₂, х.ч. в баллонах,
Вода деионизированная
Спирт этиловый ректификованный
Дезинфицирующие средства (0,2% раствор ДП-2Т, Дезолон и др.)

ТУ 6-09-08-1024-81

ГОСТ 5962-67

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.

6. Тест-штаммы микроорганизмов

Listeria monocytogenes, типичный по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам паспортизированные и депонированные в установленном порядке.

Enterobacter (Cronobacter) sakazakii, типичный по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам паспортизированные и депонированные в установленном порядке.

Campylobacter jejuni, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, типичные по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам паспортизированные и депонированные в установленном порядке.

Salmonella typhimurium, *Salmonella enteritidis*, типичные по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам паспортизированные и депонированные в установленном порядке

Staphylococcus aureus, типичный по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам паспортизированный и депонированный в установленном порядке

Штаммы необходимо сохранять в лиофильно высушенном виде. При регулярном использовании допускается сохранять в полужидком агаре в пробирках с плотно притертыми пробками, в защищенном от света месте, при температура $(5,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ с еженедельным пересевом.

При выполнении измерений в лаборатории согласно СТБ ISO 7218 были соблюдены следующие условия:

- температура воздуха при выполнении измерений $(18,0-27,0)^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление от 84 до 107 кПа (630–800) мм рт. ст.;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25°C ;
- напряжение питающей сети (230 ± 10) В;
- частота переменного тока $(50,0 \pm 0,4)$ Гц.

ГЛАВА 3

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ

7. Подготовку и стерилизацию посуды для микробиологического анализа производят согласно требованиям СТБ ГОСТ Р 51446-2001 «Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

8. При взвешивании компонентов сред и испытуемых образцов допускается погрешность 0,1%.

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

10. Необходимое значение водородного показателя рН (далее — рН) растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроксида натрия массовой концентрации 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.

11. Приготовление растворов реактивов:

11.1. Изотонический 0,85% раствор хлористого натрия (физиологический раствор):

в 100 см³ дистиллированной воды растворяют 0,85 г хлористого натрия и стерилизуют при температуре 121,0±1,0°С в течение 15 мин.

Хранят при комнатной температуре не более 14 сут.

11.2. Растворы и реактивы для окраски микроскопических препаратов по Граму, растворы красителей (кристаллического фиолетового, генцианвиолета, метилвиолета, бриллиантового зеленого, бромкрезолового пурпурного и др.), растворы гидроксида натрия и соляной кислоты для нейтрализации высококислотных продуктов готовят в соответствии ГОСТ 10444.1.

11.3. Фосфатный буферный раствор (ФБР) с рН 7,2±0,1:

в 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 0,45 г однозамещенного фосфорнокислого калия безводного КН₂РО₄, 5,34 г двухзамещенного фосфорнокислого натрия безводного, Na₂НРО₄.

Устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,2±0,1 при температуре 25,0°С. Раствор разливают в широкогорлые колбы подходящей вместимости с учетом засеваемой навески продукта (например, 900 см³ при посеве 100 г образца). Стерилизуют при температуре 121,0±1,0°С в течение 15 мин.

11.4. При добавлении к 1 дм³ ФБР хлористого натрия в количестве 9 г до стерилизации получают фосфатный буферный 0,9%-й раствор NaCl.

11.5. Забуференная пептонная вода (ЗПВ):

в 1000 см³ дистиллированной воды при нагревании растворяют 10 г пептона, 5 г хлористого натрия, 9 г двухзамещенного фосфорнокислого натрия 12-водного, Na₂НРО₄·12Н₂О, 1,5 г однозамещенного фосфорнокислого калия, КН₂РО₄. Устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,0±0,2 при температуре 25,0°С. Разливают в широкогорлые колбы и флаконы подходящей

вместимости с учетом засеваемой навески продукта (например, 225 см³ при посеве 25 г, 450 см³ при посеве 50 г образца и т. п.). Стерилизуют при температуре 121,0±1,0°C в течение 15 мин.

11.6. ЗПВ с обезжиренным молочным порошком для неселективного обогащения при исследовании какао и какаосодержащих продуктов на содержание бактерий рода *Salmonella*:

Перед стерилизацией в 1000 см³ ЗПВ добавляют 100 г обезжиренного молочного порошка.

11.7. Аэротолерантная добавка для селективных бульонов Престона и Дойла: растворяют 6,25 г натрия пировинограднокислого в 10–20 см³ стерильной дистиллированной воды, после растворения доводят объем воды до 100 см³. Добавляют 6,25 г железа (II) сернокислого и столько же натрия метабисульфита. Разливают в пробирки по 4 см³. Хранят в защищенном от света месте при температуре минус 20°C не более 1 мес. Раствор чрезвычайно чувствителен к воздействию света, после его добавления к питательным средам их необходимо сохранять в защищенном от света месте.

12. Приготовление питательных сред:

12.1. Питательный агар с 1% глюкозы и питательный бульон с 1% глюкозы (МПА с 1% глюкозы, МПБ с 1% глюкозы) готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1-84 «Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

12.2. Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом, триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (ТСБДЭ и ТСАДЭ, TSUEA):

в 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 17,0 г ферментативного гидролизата казеина, 3,0 г пептона соевого, 5,0 г натрия хлористого, 2,5 г фосфата калия однозамещенного, 2,5 г глюкозы, 6,0 г дрожжевого экстракта, 15,0 г агара микробиологического (для ТСАДЭ).

Компоненты тщательно перемешивают, устанавливают рН 7,3±0,2 и автоклавируют при 121°C в течение 15 мин. Готовые среды разливают в стерильные колбы или пробирки и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8,0°C.

12.3. Среда Кесслер:

в 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 2,5 г глюкозы, 5 г желчи крупного рогатого скота сухой (50 см³ натуральной); 2 см³ 1%-о водного раствора кристаллического фиолетового (генцианвиолета, метилвиолета). Нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1–2 мин, доводят объем до 1 дм³, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45–55°C. Устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,3±0,2 при температуре 25°C. Разливают в пробирки с поплавками по 10 см³, автоклавируют при 114,0±1,0°C в течение 20 мин.

12.4. Глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью:

в 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г глюкозы, 6,45 г двухзамещенного фосфорнокислого натрия безводного, Na₂HPO₄, 2 г однозамещенного фосфорнокислого калия безводного, KH₂PO₄, 20 г желчи крупного

рогатого скота сухой (200 см³ натуральной), 3 см³ 0,5%-го водного раствора бриллиантового зеленого.

Нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1-2 мин., доводят объем до 1 дм³, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45,0-55,0°C. Устанавливают рН таким образом, чтобы он составлял 7,2±0,1 при температуре 25,0°C, после чего повторно доводят до кипения. Разливают в стерильные пробирки с поплавками по 10 см³.

12.5. Бульон Мак-Конки с глюкозой: в колбу с 1 дм³ воды дистиллированной вносят 20 г пептона, 10 г глюкозы, 5 г хлористого натрия, 5 г желчи крупного рогатого скота сухой, 1 см³ 1,0%-ного щелочного раствора бромкрезолового пурпурного.

Все ингредиенты растворяют в воде, нагревают до полного растворения компонентов, устанавливают рН (7,5±0,1), фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы по 100 см³ и стерилизуют при температуре 121,0±1,0°C в течение 20 мин; хранят при температуре 5,0±3,0°C не более 14 сут.

12.6. Среда Кесслер с лактозой: в колбу с 1 дм³ воды дистиллированной вносят 10 г пептона, 2,5 г лактозы, 5 г желчи крупного рогатого скота сухой, 2 см³ 1%-го водного раствора кристаллического фиолетового (генцианвиолета, метилвиолета). Нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1-2 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доводят объем до 1 дм³, охлаждают до 45,0-55,0°C. Устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,2±0,1 при температуре 25°C. Разливают в колбы (флаконы) по 225 см³, автоклавируют при 115±1,0°C в течение 20 мин.

12.7. Лактозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью: в колбу с 1 дм³ воды дистиллированной вносят 10 г ферментативного перевара казеина, 10 г лактозы, 20 г желчи крупного рогатого скота сухой, 2,66 см³ 0,5%-го водного раствора бриллиантового зеленого. При нагревании растворяют компоненты в воде. Устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,2±0,2 при температуре 25,0 С. Разливают в колбы (флаконы) по 225 см³, автоклавируют при 121,0±1,0°C в течение 15 мин.

12.8. Грам-негативный обогащающий бульон (GN-бульон) по Хайну готовят по прописи, указанной на этикетке из сухой среды промышленного производства.

12.9. Селенитовый бульон в модификации Лейфсона: готовят из двух растворов. Раствор 1: в колбу с 1 дм³ воды дистиллированной вносят 5 г пептона, 3 г натрия фосфорнокислого однозамещенного безводного, 7 г натрия фосфорнокислого двухзамещенного безводного, 4 г лактозы.

При нагревании растворяют в воде. Путем изменения количественных соотношений фосфатов устанавливают рН (7,0±0,1). Разливают во флаконы или колбы по 100 см³, стерилизуют при 112,0±1,0°C 30 мин. Раствор можно хранить в холодильнике 1-2 мес.

Раствор 2: 10%-й раствор кислого селенисто-кислого натрия готовят по мере необходимости на стерильной дистиллированной воде.

Перед началом посева в каждый флакон с 100 см³ раствора 1 добавляют по 4 см³ раствора 2.

Готовую среду асептически разливают в стерильные пробирки по 10 см³ или в колбы (флаконы) по 225 см³ и плотно закрывают пробками. Дальнейшей стерилизации не требуется.

12.10. Маннитный селенитовый бульон: в колбу с 1 дм³ воды дистиллированной вносят 5 г пептона, 4 г маннита, 10 г натрия фосфата, 4 г кислого селенисто-кислого натрия. Перемешивают при подогревании до полного растворения солей, разливают в колбы (флаконы) по 225 см³. Стерилизуют текучим паром в течение 10 мин.

12.11. Среда Раппапорта–Вассилиадиса с соей (RVS-бульон):

раствор 1: в колбу с 1 дм³ воды дистиллированной вносят 5 г ферментативного гидролизата сои, 8 г хлористого натрия, 0,2 г двухзамещенного фосфорнокислого калия безводного, K₂HPO₄, 1,4 г однозамещенного фосфорнокислого калия безводного K₂HPO₄. Нагревают до температуры 70,0°C. Раствор готовят за день до приготовления среды;

раствор 2: растворяют 400 г хлористого магния 6-водного (MgCl₂·6H₂O) в 1 дм³ воды дистиллированной, переносят в бутылку из темного стекла с притертой пробкой и хранят при комнатной температуре. В виду гигроскопичности хлористого магния раствор следует готовить, используя вновь вскрытую упаковку реактива;

раствор 3: растирают 0,4 г малахитового зеленого оксалата в ступке. Переливают в мерную колбу, доводят водой до 1 дм³. Хранят в бутылке из темного стекла не более 8 мес.

Среду готовят, прибавляя к 1 дм³ раствора 1–100 см³ раствора 2 и 10 см³ раствора 3. Устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 5,2±0,2 при температуре 25,0°C. Разливают в пробирки по 10 см³, автоклавируют при 115,0±1,0°C в течение 15 мин.

12.11. Мюллер–Кауфман тетрационатный бульон (МКТ-бульон) готовят в соответствии с прописью, указанной в ГОСТ Р 52814-2007 (ИСО 6579-2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*».

12.12. Селективный бульон Престона для накопления кампилобактерий:

в колбу с 920 см³ воды дистиллированной вносят 10 г пептона, 10 г мясного экстракта, 5 г натрия хлорида. При необходимости подогревают до кипения для полного растворения частиц. Устанавливают рН (7,5±0,2) с помощью 0,1 М HCl или 0,1 М NaOH. Стерилизуют автоклавированием при температуре 121,0°C в течение 15 минут. Остужают до 45,0–50,0°C.

Перед использованием в 920 см³ бульона асептически добавляют: 70 см³ стерильной дефибринированной крови барана; растворенное в 50%-м растворе ацетона содержимое двух флакончиков с добавкой антибиотиков для кампилобактерий IV (по Престону) и растворенное в стерильной дистиллированной воде содержимое двух флакончиков ростовой добавки для кампилобактерий или 4 см³ аэротолерантной добавки, тщательно перемешивают и разливают среду в соответствующие емкости в количествах, необходимых для проведения исследования.

12.13. Селективный бульон Дойла для накопления кампилобактерий:

для приготовления основы в колбу с 920 см³ воды дистиллированной вносят 10,0 г гидролизата казеина; 10,0 г пептического перевара животной ткани; 2,0 г

дрожжевого экстракта; 1,0 г глюкозы; 5,0 г натрия хлорида; 0,1 г натрия бисульфита; 3,0 г натрия сукцината; 0,1 г L-цистеина гидрохлорида.

При необходимости подогревают до кипения для полного растворения частиц. Устанавливают рН ($7,0 \pm 0,2$) при $25,0^\circ\text{C}$. Стерилизуют автоклавированием при температуре $121,0^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. Остужают до температуры 45°C .

Для приготовления готовой среды перед использованием в 460 см^3 основы асептически добавляют 35 см^3 стерильной дефибрированной крови барана, а также растворенное в 5 мл 50%-го раствора этанола содержимое 1 флакончика с добавкой антибиотиков модифицированной III (по Дойлу). Тщательно перемешивают и разливают в соответствующие емкости в количествах, необходимых для исследования.

12.14. Бульоны Фрейзера для предварительного селективного (первичного) обогащения и селективного (вторичного) обогащения *Listeria monocytogenes*. Для приготовления основы среды в 1000 см^3 дистиллированной воды растворяют: 5,0 г ферментативного гидролизата казеина; 5,0 г пептона; 5,0 г мясного экстракта; 5,0 г дрожжевого экстракта; 20,0 г натрия хлористого; 1,35 г калия фосфорнокислого однозамещенного безводного; 12,0 г натрия фосфорнокислого двухзамещенного безводного; 1,0 г эскулина; 3,0 г лития хлористого; 0,25 г железа аммонийного цитрата. Тщательно перемешивают, устанавливают рН ($7,2 \pm 0,2$) и автоклавируют при $121,0^\circ\text{C}$ 15 мин.

В зависимости от предназначения среды перед употреблением к 1 дм^3 основы бульона Фрейзера асептически добавляют селективные компоненты, предварительно растворенные в 10 см^3 стерильного раствора гидроокиси натрия с концентрацией $0,2 \text{ г/дм}^3$, в количестве:

- для предварительного селективного обогащения: 10 мг налидиксовой кислоты, 12,5 мг акрифлавина гидрохлорида.

- для селективного обогащения: 20 мг налидиксовой кислоты, 25 мг акрифлавина гидрохлорида.

Готовые среды разливают в стерильные колбы: бульон Фрейзера для предварительного селективного обогащения - в объемах, в 9 раз превышающих массу (объем) навески засеваемого продукта; бульон Фрейзера для селективного обогащения — по 90 см^3 и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 6°C не более 3 недель.

12.15. Солевой бульон:

в колбу со 100 см^3 мясо-пептонного бульона вносят 6,0 г хлорида натрия, устанавливают рН ($6,9 \pm 0,1$), разливают во флаконы и стерилизуют при температуре ($121,0 \pm 1,0$) $^\circ\text{C}$ в течение 20 мин; хранят при температуре $5,0 \pm 3,0^\circ\text{C}$ не более 14 сут.

12.16. Желточно-солевой агар:

эмульсия яично-желточная: куриное яйцо протирают ватой, смоченной этиловым спиртом, помещают в стерильную чашку Петри, стерильным инструментом пробивают с противоположных сторон яйца два отверстия. Через одно отверстие полностью удаляют белок, затем, увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу с 50 см^3 физиологического раствора, содержимое встряхивают до однородной массы; хранят при температуре $5,0 \pm 3,0^\circ\text{C}$ не более 72 ч.

1 дм³ мясо-пептонного агара перед анализом расплавляют и растворяют в нем 95,0 г хлористого натрия, охлаждают до температуры (45,0±1,0)°С и добавляют 100 см³ яично-желточной эмульсии. Смесь тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри; хранят при температуре 5,0±3,0°С не более 5 сут.

12.17. Агар Байрд–Паркер:

в 1 дм³ мясопептонного бульона вносят 17,9 г лития хлорида, 15,0 г агара микробиологического в волокнах или порошке, 5,0 г мясного экстракта и 5,0 см³ экстракта дрожжевого, перемешивают и нагревают до полного растворения компонентов. Охлаждают до 50,0–60,0°С, устанавливают рН (6,9±0,1), разливают во флаконы по 100 см³ и стерилизуют при температуре 121,0±1,0°С в течение 20 мин.

К 90 см³ основы среды добавляют асептически 5,0 см³ желточной эмульсии и стерилизованные фильтрованием через мембранный фильтр растворы: 6,3 см³ раствора глицина концентрации 200 г/дм³, 5,0 см³ раствора пирувата натрия концентрации 200 г/дм³ и 1,0 см³ раствора теллурита калия концентрации 10 г/дм³; хранят при температуре 5,0±3,0°С не более 48 ч.

12.18. XLD-агар:

в колбу с 1000 см³ дистиллированной воды вносят 3,5 г ксилозы, 5,0 г L-лизина, 7,5 г лактозы, 7,5 г сахарозы, 5,0 г натрия хлорида, 3,0 г дрожжевого экстракта, 0,08 г фенолового экстракта, 2,5 г дезоксихолата натрия, 6,8 г натрия тиосульфата, 0,8 г железа-аммония цитрата, 13,5 г агара. Перемешивают и нагревают до полного растворения компонентов. Охлаждают до 50,0–60,0°С, устанавливают рН (7,4±0,2).

12.19. Висмут-сульфит агар для селективного выделения бактерий рода *Salmonella*:

в колбу с 1000 см³ дистиллированной воды вносят 16,6 г панкреатического гидролизата кильки, 16,4 г агара микробиологического, 4,7 г Д(+)-глюкозы, 7,6 г агароида, 2,24 г висмута лимоннокислого, 4,28 г сульфита натрия безводного, 1,32 г соли Мора, 3,63 г динатрия фосфата обезвоженного, 0,017 г бриллиантового зеленого, 0,63 г соды кальцинированной, 2,6 г натрия хлорида.

12.20. Модифицированный агар с углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (агар mCCD):

базовая среда: В колбу с 1000 см³ дистиллированной воды вносят 10,0 г мясного экстракта, 10,0 г продукта ферментативного переваривания животных тканей, 5,0 г натрия хлорида, 4,0 г древесного угля, 3,0 г продукта ферментативного переваривания казеина, 1,0 г натрия дезоксихолата, 0,25 г железа (II) сульфата натрия пирувата, 8,0–18,0 г агара.

Основные компоненты или полную обезвоженную базовую среду растворяют в воде, доводя до кипения. При необходимости корректируют рН так, чтобы после стерилизации он был равен 7,4±0,2 при температуре 25,0°С. Базовую среду переносят в колбы подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121°С в течение 15 мин.

Антибиотический раствор:

в 5 см³ дистиллированной воды растворяют 0,032 г цефоперазона, 0,01 г амфотерицина В. Стерилизуют путем фильтрации.

Полная среда:

к 1000 см³ антибиотического раствора добавляют 5 см³ базовую среду, охлажденную до 47,0±2,0°C, затем тщательно перемешивают. Около 15 см³ полной среды добавляют в стерильные чашки Петри. Дают затвердеть. Непосредственно перед использованием тщательно высушивают агаровые чашки, предпочтительно с открытыми крышками и поверхностью агара вниз, в сушильном шкафу в течение 30 мин или до тех пор, пока поверхность агара не утратит видимую влагу. Если их готовят заранее, невысушенные агаровые чашки следует хранить не более 4 ч при комнатной температуре или в темноте при 5,0±3,0°C не более 7 дней.

12.21. Селективная среда для импедиметрического выявления патогенных бактерий рода *Salmonella* в продовольственном сырье и пищевых продуктах:

в колбу с 1000 см³ дистиллированной воды вносят 4,0–5,0 г гидролизата казеина, 1,0–1,5 г дрожжевого экстракта, 7,0–7,5 г натрия хлорида, 1,6–1,7 г калия дигидрофосфата, 20,0–40,0 г магния хлорида шестиводного, 0,03–0,04 г малахитового зеленого, 0,6–1,0 г дигидрата триметиламина оксида, 0,8–0,9 г биселенита натрия. Довести рН до 5,6±0,4.

ГЛАВА 4

ПОДГОТОВКА ПРОБ

13. Для определения наличия патогенных микроорганизмов следует использовать образцы испытуемых изделий, не подвергавшихся внешнему воздействию.

14. Отбор проб осуществляют с соблюдением правил асептики, чтобы исключить вторичное загрязнение продукта, в установленном порядке согласно требованиям нормативных и технических документов на конкретные виды продуктов.

14.1. Отбирают $200,0 \pm 50,0$ г (см^3) (или в соответствии с требованиями нормативного документа) средней пробы с соблюдением правил асептики.

14.2. Для анализа на наличие бактерий рода *Campylobacter* пробы твердых продуктов отбирают по МУК 4.2.2321-08 в стерильные газонепроницаемые пакеты, пробы жидких продуктов — в герметично закрывающуюся стерильную стеклянную посуду или иные емкости и приспособления, ограничивающие доступ кислорода.

14.3. Доставку образцов скоропортящихся продуктов в лабораторию осуществляют в термоконтейнерах при температуре не выше $6,0^\circ\text{C}$; замороженных продуктов — при температуре, указанной в нормативной или технической документации на продукт. Анализ доставленных образцов проводят по возможности в кратчайшие сроки, но не более чем через 4 ч от момента отбора.

14.4. Для предотвращения ингибиции или утраты жизнеспособности патогенной флоры, все манипуляции с пробами пищевых продуктов необходимо осуществлять с учетом биологических особенностей и чувствительности искомым патогенных бактерий к изменениям температуры, pH, воздействию УФ, нагреванию, длительному хранению.

14.5. До анализа пробы сохраняют в сухом защищенном от света месте, в т. ч. образцы скоропортящихся продуктов — при температуре $5,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, охлажденных сырых мясных и рыбных продуктов — при температуре $2,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$. После вскрытия упаковки пробы подвергают исследованию немедленно.

14.6. Подготовку проб проводят по ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов», ГОСТ Р ИСО 7218-2008 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям», а также в соответствии с действующими нормативно-методическими документами на конкретные виды продуктов.

Замороженные продукты предварительно размораживают в защищенном от света месте при температуре $2,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ в течение не более 18 ч или в течение 1 ч в термостате при температуре $19,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

Пробы жировых продуктов (топленое масло, молочный жир, спрэды, маргарины, кремы) расплавляют при температуре $40,0$ – $45,0^\circ\text{C}$ на водяной бане, перемешивают до получения однородной эмульсии; масло сливочное и мороженое — до сметанообразной консистенции.

14.7. Отобранные объединенные образцы доводят до однородной консистенции для суспендирования содержащихся в пробе микроорганизмов:

жидкие и порошкообразные перемешивают, твердые измельчают в перистальтическом или ножевом гомогенизаторе (при необходимости плотные пробы предварительно измельчают ножницами или добавляют определенные количества соответствующей среды для неселективного или селективного обогащения) с соблюдением требований асептики.

При исследовании на наличие бактерий рода *Campylobacter* продукт измельчают только в перистальтическом гомогенизаторе или в фарфоровой ступке, избегая активного перемешивания; жидкие продукты перемешивают круговыми движениями.

14.8. Из суспензии или гомогената готовят навеску необходимой массы. Если нормативной документацией не предусмотрено иное, для пищевых продуктов масса навески (объем) для анализа на патогены должна составлять $25,0 \pm 0,1$ г (см^3), не менее. Величина навески для продуктов детского и диетического питания находится в диапазоне от $25,0 \pm 0,1$ – $300,0 \pm 1,0$ г (см^3) и должна определяться установленными гигиеническими нормативами.

От подготовленной пробы жировых продуктов отбирают навеску не менее 50 г, которую центрифугируют при 10000 – 20000 x g (12000 – 16000 об./мин) в течение 1 мин при охлаждении (допускается проводить центрифугирование при температуре не выше 15°C). Удаляют асептически супернатант и слой жира, исследованию подвергают седимент (осадок).

14.9. В кислых или кислотосодержащих (с $\text{pH} < 6,0$) жидких пищевых продуктах для предотвращения снижения pH питательных сред на $0,5$ и более pH при посеве доводят pH аналитической навески до $7,0 \pm 0,2$ стерильными растворами гидроксида натрия и соляной кислоты перед посевом; в твердых высококислотных продуктах — pH доводят до $7,0 \pm 0,2$ после посева непосредственно в посевной жидкости. Измерения pH проводят в условиях асептики.

14.10. Приготовление объединенной пробы, навесок продукта и посев осуществляют в максимально короткие сроки.

14.11. Для подращивания находящихся в пищевых продуктах патогенных бактерий и накопления их биомассы подготовленные образцы засевают в жидкие питательные среды и инкубируют в соответствии с процедурами обогащения, предусмотренными утвержденными в установленном порядке методами исследований для конкретных микроорганизмов.

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

14.12. Первичный посев пищевых продуктов для накопления бактерий рода *Salmonella* проводят в неселективную жидкую среду — ЗПВ (п. 11.5), подогретую до $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, при соотношении навески продукта и среды 1:9. Например, навеску массой 25 г засевают в 225 см^3 ЗПВ, 50 г — в 450 см^3 ЗПВ и т. п. Инкубируют при этой температуре $18,0 \pm 2,0$ ч. При исследовании какао и какаосодержащих продуктов используют ЗПВ с обезжиренным молочным порошком (п. 11.6), в

которую после 2 ч инкубации добавляют 0,5%-й водный раствор бриллиантового зеленого из расчета 3,6 см³ на 1 дм³ инокулята.

По истечении инкубации в ЗПВ проводят вторичное обогащение параллельно в двух жидких селективных средах: по п. 12.11 (Раппапорта–Вассилиадиса с соей) и одной из двух сред по п. 12.9 (селенитовом бульоне) или п. 12.11 (Мюллер–Кауфман тетрационатном бульоне), для чего по 1 см³ инокулята в ЗПВ пересевают в 10 см³ каждой из указанных сред. Посевы в среде Раппапорта–Вассилиадиса с соей инкубируют при 41,5±1,0°С 24 ч, в селенитовом бульоне и Мюллер–Кауфман тетрационатном бульоне — при 37,0±1,0°С 24 ч.

Допускается высевать образцы свежих пищевых продуктов, не содержащих сублетально поврежденных бактерий рода *Salmonella* в результате сушки, замораживания, непосредственно в селективные среды, минуя этап неселективного обогащения, при соотношении продукта и среды 1:9, не менее, при тех же режимах инкубации.

Для исследований в ПЦР используют культуральную жидкость среды Раппапорта–Вассилиадиса с соей и одной из двух сред — селенитового бульона или Мюллер–Кауфман тетрационатного бульона.

14.13. Первичный посев пищевых продуктов для неселективного накопления энтерогеморрагических веротоксигенных *E. coli*, в т. ч. серотипа O157:H7, проводят аналогично посеву на бактерии рода *Salmonella*, при соотношении навески продукта и среды 1:9, засевая по 25 г пробы в 225 см³ неселективной жидкой среды ЗПВ по п. 11.5, подогретой до 37,0±1,0°С. Инкубируют при этой температуре 18,0±2,0 ч.

По истечении инкубации в ЗПВ проводят вторичное обогащение, для чего по 1 см³ инокулята пересевают параллельно в пробирки с 10 см³ жидкой селективной среды с лактозой: Кесслер с лактозой по п. 12.6, лактозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью по п. 12.7, грам-негативный обогащающий бульон (GN-бульон) по Хайну по п. 12.8.

Молочные продукты подлежат посеву только в среду Кесслер с лактозой по п. 12.6.

Посевы термостатируют при 37,0±1,0°С в течение 18–24 ч.

Допускается высевать образцы свежих пищевых продуктов (мясопродукты сырые, молоко-сырье, цельномолочные продукты, в том числе творог, сыр, плодоовощные продукты), не содержащих сублетально поврежденных веротоксигенных *E. coli* в результате сушки, замораживания, непосредственно в селективные среды, минуя этап неселективного обогащения, при соотношении продукта и среды 1:9, при тех же режимах инкубации.

Для исследований в ПЦР используют культуральную жидкость любой из вышеуказанных селективных сред.

14.14. Первичный посев пищевых продуктов для детей раннего возраста (молочные смеси и продукты прикорма сухие, а также специализированные продукты для лечебного и профилактического питания детей 1 года жизни, подлежащие контролю на наличие *E. sakazakii* проводят в неселективные жидкие среды: ФБР (п. 11.3) или ЗПВ (п. 11.5), исходя из соотношения навески продукта и среды 1:10.

К навеске массой $300,0 \pm 1,0$ г добавляют $2,7$ дм³ неселективной среды, подогретой до $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, термостатируют при температуре $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 18–24 чв.

По истечении инкубации в ФБР или ЗПВ проводят вторичное обогащение, для чего по 10 см³ суспензии пересевают в 90 см³ жидких селективных сред для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* - среду Кесслер с глюкозой (п. 12.3), или глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью (п. 12.4), или бульон Мак-Конки (п. 12.5). Посевы термостатируют при температуре $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение $22,0 \pm 2,0$ ч.

Для исследований в ПЦР используют культуральную жидкость не менее чем из 2 указанных выше питательных сред для селективного обогащения.

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

К необходимому количеству подготовленной по пп. 14.2 и 14.8 пробы добавляют 9-кратный объем селективного бульона Престона (п. 12.12) или селективного бульона Дойла (п. 12.13). При исследовании жировых молочных продуктов седимент, приготовленный согласно п. 14.9, предварительно растворяют в 10 см³ обогащающего бульона и добавляют к остальному объему среды. Полученную взвесь инкубируют в течение 4 ч при $37,0^\circ\text{C}$ (а в случае посевов замороженных продуктов или продуктов, которые хранились более 10 дней, — в течение 3 ч при температуре $32,0^\circ\text{C}$ и 2 ч при $37,0^\circ\text{C}$). Далее температуру инкубации изменяют, и все посевы продолжают инкубировать в течение 18–24 ч при $42,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

Инкубация на всех этапах осуществляется в микроаэрофильных условиях.

Для исследований в ПЦР используют культуральную жидкость любой из вышеуказанных селективных сред.

14.16. Первичный посев пищевых продуктов для накопления бактерий *L. monocytogenes* проводят в бульон Фрейзера для предварительного селективного обогащения (п. 12.14). Подготовленную навеску массой 25 г (см³) вносят непосредственно в 225 см³ среды, предварительно прогретой в течение 15 мин при температуре $45,0^\circ\text{C}$. Содержимое в колбе встряхивают круговыми движениями руки в радиусе 30 см. При необходимости анализа других масс (объемов) продукта их посев проводят в среду также в соотношении 1:9 по объему.

Посевы термостатируют при $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение $24,0 \pm 2,0$ ч. В среде предобогащения, содержащей эскулин и цитрат железа аммонийного, отмечают почернение как признак возможного присутствия бактерий рода *Listeria*, способных к гидролизу гликозида эскулина до глюкозы и эскулетина. Эскулетин реагирует с ионами железа, образуя комплекс черного или оливкового цвета. На среде без эскулина почернения не наблюдается.

После инкубации продукта в среде для первичного обогащения независимо от наличия или отсутствия признаков роста, в том числе почернения, пересевают $1,0$ см³ суспензии в 10 см³ бульона Фрейзера для вторичного селективного обогащения листерий по п. 12.14, предварительно нагретого до температуры $41,0^\circ\text{C}$. Посевы термостатируют при температуре $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение $24,0 \pm 2,0$ ч.

Для исследований в ПЦР используют культуральную жидкость среды (бульона Фрейзера) для вторичного селективного обогащения листерий.

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

14.17. Первичный посев пищевых продуктов для накопления бактерий *Staphylococcus aureus* проводят в солевой бульон для предварительного селективного обогащения (п. 12.15). Подготовленный образец в количестве 10 см³ (или в соответствии с требованиями нормативного документа) вносят во флакон с 90 см³ среды. Содержимое перемешивают и инкубируют в течение 24 ч при температуре 37,0±1,0°C.

После инкубации продукта в среде для первичного обогащения при наличии признаков роста делают пересев обогащенной культуры петлей на одну из следующих сред: Байрд–Паркер агар и желточно-солевой агар, инкубируют в течение 18–24 ч при 37,0±1,0°C.

При росте на желточно-солевом агаре бактерии вида *Staphylococcus aureus* образуют круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара колонии с ровными краями диаметром 2–2,5 мм, окрашенные в желтый, золотистый, кремовый, палевый или белый цвет, окруженные зоной лецитиназной активности.

На среде Байрд-Паркер бактерии вида *Staphylococcus aureus* растут в виде черных блестящих колоний диаметром 1–1,5 мм, окруженных зоной лецитиназной активности.

Для исследований в ПЦР используют культуральную жидкость среды (солевого бульона).

15. Подготовка образцов к ПЦР-анализу

15.1. Подготовленные образцы используют для ПЦР-анализа сразу после окончания инкубации. Для подтверждения жизнеспособности допускается однократное замораживание (сразу после инокуляции в среду обогащения) и хранение образцов культуральной жидкости при температуре минус 20,0°C на время инкубации парного образца.

15.2. При подтверждении жизнеспособности выявляемых патогенных микроорганизмов путем ПЦР-анализа в режиме реального времени, параллельно с пробами, обогащаемыми в питательных средах, готовят контрольные образцы пищевых продуктов, не подвергающиеся инкубации.

Эти образцы после инокуляции подвергают замораживанию и сохраняют до момента исследования в ПЦР при температуре минус 20,0°C, исследуя впоследствии одновременно с образцами, прошедшими подращивание. Инокуляты образцов, подлежащие подращиванию, направляют на инкубацию, как описано в пп. 14.13–14.17.

15.3. Пробы жидких продуктов тщательно перемешивают и инокулируют их равные объемы в среды неселективного или селективного обогащения в соответствии с требованиями пп. 14.13–14.17.

15.4. К пробам продуктов плотной консистенции на этапе гомогенизации по п. 14.8 добавляют определенное количество соответствующей среды для конкретных искомым микроорганизмов, тщательно перемешивают. Из гомогената

отбирают навеску необходимой массы, которую в условиях асептики разделяют на две равные части и засевают в соответствии с требованиями пп. 14.12–14.18 объемы питательных сред с учетом количества, добавленного при гомогенизации.

15.5. Образцы, подлежащие использованию для подтверждения жизнеспособности, непосредственно после инокуляции подвергают замораживанию и сохраняют до момента исследования в ПЦР при температуре -20°C . Инокуляты образцов, подлежащие подращиванию, направляют на инкубацию, как описано в пп. 14.13–14.17.

15.6. Для исследований в ПЦР в режиме реального времени для подтверждения жизнеспособности одновременно используют инокуляты пищевых продуктов в питательных средах для селективного обогащения, подвергавшиеся и не подвергавшиеся инкубации в термостате.

15.7. Стерильные образцы соответствующих сред для первичного обогащения должны сохраняться для использования в качестве отрицательных контрольных образцов исследования методом ПЦР.

15.8. При идентификации культур, выделенных из пищевых продуктов согласно утвержденным в установленном порядке методам исследований, используют изолированные колонии, характерные для патогенных микроорганизмов, полученные на чашках с селективными агаризованными средами после соответствующего обогащения, в т. ч. для бактерий:

- рода *Salmonella* — с ксилоза-лизин-дезоксихолатным агаром, висмут-сульфитным агаром, средой Плоскирева, Эндо, Левина, бриллиантовым зеленым агаром;

- вида *E. sakazakii* — фиолетово-красным желчным агаром с глюкозой (VRBG agar), средой Эндо, триптон-соевым агаром с дрожжевым экстрактом;

- серотипа *E. coli* O157:H7 — сорбитол *E. coli* O157:H7 агаром, флуорокульт *E. coli* O157:H7 агаром, сорбитол Мак-Конки агаром (SMAC), средой Эндо;

- рода *Campylobacter* — селективным агаром Престона, угольным селективным агаром для кампилобактерий, колумбийским агаром;

- вида *L. monocytogenes* — ПАЛКАМ-агаром (полимиксин-акрифлавин-лития хлорид-цефтазидим-эскулин-маннитол агаром), оксфордским агаром, ПАЛ-агаром, кровавым агаром, лецитин агаром;

- вида *Staphylococcus aureus* — Байрд–Паркер агаром и желточно-солевым агаром или молочно-желточно-солевым агаром.

15.9. Не менее 3 характерных колоний для бактерий родов *Salmonella*, серотипа *E. coli* O157:H7, видов *L. monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* отбирают с одной или нескольких указанных в п. 15.1 селективных сред, производят посев штрихом на поверхность плотных питательных сред МПА или ТСАДЭ по пп. 12.1 и 12.2 в отдельных чашках Петри, или в пробирки с жидкими средами (МПБ или триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом) и инкубируют в течение 18–24 ч при $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Изоляты, предположительно относящиеся к роду *Campylobacter*, засевают на поверхность кровавого колумбийского агара или в бульон для бруцелл и инкубируют при $42,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ в течение 24–48 ч в микроаэрофильной атмосфере.

Изоляты, предположительно относящиеся к *E. sakazakii*, пересевают на поверхность триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом и термостатируют при температуре 25,0°C в течение 72 ч.

15.10. При необходимости культуры могут быть представлены на исследование в пробирках на агаризованной среде. В указанном случае производят проверку штамма на чистоту путем микроскопирования, пересевают в пробирки с жидкими средами (ТСБДЭ) или другими средами, предназначенными для обогащения данного патогена, и инкубируют в течение 24 ч при 37,0±1,0°C.

15.11. Суточные культуры, полученные по п. 15.2 на плотных питательных средах, смывают с поверхности агара небольшим количеством стерильного физиологического раствора (или снимают петлей) и переносят в стандартную пробирку. Концентрацию бактериальных клеток в суспензии проверяют по оптическому стандарту МакФарланда либо денситометрически на приборах, откалиброванных также по шкале МакФарланда (плотность суспензии должна составлять не менее 1,5–2,0 ед. по шкале МакФарланда). При использовании отраслевого стандарта для визуальной оценки мутности расчетная концентрация клеток в пробе должна составлять не менее 10⁷ кл./см³. Аналогичным образом устанавливают плотность культур на жидких средах.

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

Для исследований в ПЦР используют подготовленные указанным образом взвеси микроорганизмов или бульонные культуры, содержащие не менее 10⁷ клеток/см³, которые подвергают дальнейшим манипуляциям для выделения ДНК. Подготовленные образцы используют для анализа в тот же день.

15.12. Образцы пищевых продуктов, предназначенные к исследованию в нативном виде, подлежат первичной обработке в зависимости от консистенции: путем концентрирования (для жидких продуктов) или перевода в жидкую фазу с последующим концентрированием (для сухих или твердых продуктов).

15.13. Концентрирование образцов жидкой консистенции объемом до 50 см³ путем центрифугирования проводят в условиях асептики по одному из двух режимов:

а) одномоментно при 6000 об./мин в течение 18±2 мин;

б) дробно при 1000 об./мин в течение 5 мин для осаждения крупных частиц и при 6000 об./мин в течение 15 мин.

По окончании центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 5 см³ фосфатного буферного 0,9%-го раствора NaCl (п. 11.1), ресуспендируют.

Для экстракции ДНК отбирают 1 см³ взвеси в отдельную пробирку; оставшаяся часть подготовленной пробы используется для посева на питательные среды.

15.14. Концентрирование образцов жидкой консистенции объемом до 50 см³ фильтрацией проводят в 2 этапа:

1) для освобождения от крупных частиц во избежание засорения мембранных фильтров - с использованием стерилизованных ватно-марлевых или бумажных фильтров;

2) через мембранные фильтры № 3 с величиной пор 600–800 нм.

Для фильтрования через мембранные фильтры используют предварительно простерилизованные фильтровальные аппараты, подключенные к вакуумному насосу, или фильтрующие устройства шприцевого типа соответствующей емкости.

Перед началом фильтрования мембранные фильтры проверяют на отсутствие дефектов, и в случае необходимости двукратно кипятят в дистиллированной воде по 10–15 мин. С соблюдением правил асептики фильтры закрепляют в аппарате матовой стороной вверх. Фильтрование проводят дробно, пропуская через каждый фильтр не более 25 см³ жидкости, подвергнутой на 1 этапе фильтрации через ватно-марлевый или бумажный фильтр.

После окончания фильтрации, фильтрат удаляют, а все использованные фильтры переносят в стерильную чашку Петри, бюкс, измельчают стерильными ножницами и заливают 5–6 см³ стерильного изотонического раствора натрия хлористого для десорбции бактерий.

Из полученного смыва отбирают 1 см³ в отдельную пробирку для экстракции ДНК; оставшаяся часть подготовленной пробы используется для посева на питательные среды.

15.15. Пробы пищевых продуктов твердой консистенции и сухих переводят во взвешенное состояние в жидкости для суспендирования содержащихся в них микроорганизмов. Для этого образцы массой 25–50 г в условиях асептики предварительно измельчают ножницами, растирают в фарфоровой ступке или в гомогенизаторе при добавлении ФБР (п. 11.3) или стерильной деионизированной воды в соотношении 1:10 или 1:5 для получения 10–20% концентрации продукта. Доводят до гомогенного состояния.

Полученную суспензию отстаивают 3–10 мин для осаждения грубых частиц, жидкую фазу центрифугируют при 1000 об./мин в течение 5 мин.

Если полученный осадок вязкий, из него отбирают 1 см³ для экстракции ДНК в отдельную пробирку и не менее 2 см³ — для посева на питательные среды; если плотный — предварительно ресуспендируют в 0,2–0,5 см³ стерильной деионизированной воды.

15.16. Подготовленные по пп. 15.9–15.10 образцы хранению не подлежат и используются для экстракции ДНК сразу после окончания пробоподготовки.

ГЛАВА 5

ПЦР-АНАЛИЗ

16. Экстракция ДНК из исследуемых образцов:

при работе в зоне подготовки и выделения нуклеиновых кислот из проб, содержащих патогенные биологические агенты, необходимо строго соблюдать правила техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены: работать только в боксированном помещении или в боксе биологической безопасности II класса, использовать одноразовые перчатки, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую

пластиковую посуду (пробирки, наконечники) обеззараживать в специальном контейнере с дезинфицирующим 0,2%-м раствором ДП-2Т.

16.1. Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии неконкурентного внутреннего контрольного образца («ВКО») на основе рекомбинантной ДНК, для контроля правильности (точности) этапов выделения и амплификации ДНК.

16.2. В качестве отрицательного контроля («ОК») этапа экстракции ДНК из культуральной жидкости, используют стерильный образец питательной среды для обогащения исследуемого продукта, предварительно протестированный на отсутствие ДНК искомым патогенных бактерий; из проб нативных продуктов — стерильный изотонический раствор натрия хлористого или ФБР для десорбции бактерий. При наличии спорных или невалидных результатов ПЦР используют ОК этапа выделения из набора реагентов.

16.3. Экстракцию ДНК из культуральной жидкости, взвесей микроорганизмов и бульонных культур проводят без дополнительной обработки, применительно к используемым наборам реагентов и в соответствии с утвержденными в установленном порядке инструкциями.

16.4. Для экстракции ДНК применяются коммерчески доступные комплекты реагентов на основе методов сорбции ДНК на силикагеле или преципитации ДНК в соответствии с инструкцией производителя при возможности их сочетания с комплектами реагентов для амплификационного этапа исследований.

Использование автоматических экстракторов нуклеиновых кислот допускается при наличии указаний в инструкции к прилагаемым комплектам реагентов на возможность их применения при анализе данного вида образцов.

Не допускается применение упрощенных методик экстракции ДНК на основе термокоагуляции.

16.5. При повышенном содержании жиров перед экстракцией ДНК проводят дополнительную обработку пробы суспензией неполярных растворителей с водой для перевода содержащейся в пищевом продукте ДНК в водную фазу, в которой и производится дальнейшая очистка.

17. Постановка контроля на жизнеспособность патогенных бактерий в исследуемых пищевых продуктах.

17.1. При положительных результатах ПЦР-анализа образцов исследуемых нативных пищевых продуктов и культуральной жидкости от посева пищевых продуктов в среды обогащения (обнаружение ДНК искомым патогенных бактерий) должна подтверждаться жизнеспособность выявленных микроорганизмов. Оценка жизнеспособности микроорганизмов проводится параллельно с основным исследованием в обоих предусмотренных вариантах ПЦР (FEP и FRT):

17.1.1. Для образцов обогащенных пищевых продуктов: одновременно с отбором проинкубированной культуральной жидкости на экстракцию ДНК проводят ее прямой посев в количестве 0,1 см³ на поверхность соответствующих пластинчатых селективно-дифференциальных сред, используемых для выделения патогенных бактерий, указанных в п. 15.1, используют не менее 2 видов сред из числа рекомендуемых.

17.1.2. Для образцов нативных пищевых продуктов, исследуемых только при расследовании вспышек: одновременно с отбором исследуемой взвеси на экстракцию ДНК проводят ее посеvy:

а) на поверхность соответствующих пластинчатых селективно-дифференциальных сред, также как указано в п. 17.1.1;

б) в жидкую среду для селективного обогащения по пп. 14.12–14.17 по 0,1–1,0 см³ в 10 см³ соответствующих питательных сред. После инкубирования сред при соответствующих для данных микроорганизмов режимах инкубации производят пересев на поверхность соответствующих пластинчатых селективно-дифференциальных сред.

17.1.3. Посевы на плотных средах начинают просматривать через 16–18 ч, затем через 24 и 48 ч. При обнаружении роста характерных колоний (или газона культуры) их обрабатывают и анализируют путем постановки ПЦР или с использованием любых коммерчески доступных зарегистрированных тест-систем на принадлежность к родам, видам, серотипам искомым патогенных бактерий. Допускается подтверждать принадлежность выделенных культур методами традиционного биохимического и серологического типирования в соответствии с утвержденными методами определения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах.

17.1.4. Оценку жизнеспособности патогенных бактерий при осуществлении варианта ПЦР в режиме «реального времени» (FRT) допускается проводить путем одновременного исследования двух образцов культуральной жидкости.

17.1.5. При исследовании штаммов чистых культур по п. 15 подтверждение жизнеспособности не требуется.

18. ПЦР

18.1. ПЦР для выявления ДНК патогенных бактерий (родов *Salmonella*, вида *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii*, энтерогеморрагических веротоксигенных *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) осуществляется с использованием наборов реагентов, обеспечивающих постановку любого их двух вариантов гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации — по конечной точке (вариант FEP) и в режиме реального времени (вариант FRT).

18.2. Постановка ПЦР для выявления ДНК бактерий родов *Salmonella*, вида *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii*, энтерогеморрагических веротоксигенных *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* осуществляется по схемам и алгоритмам, рекомендованным производителем комплектов реагентов с обязательным применением внутренних контрольных образцов с этапа экстракции ДНК.

18.3. Для оценки жизнеспособности микроорганизмов может применяться ПЦР только в формате детекции продуктов амплификации в режиме реального времени (FRT).

18.4. Положительные результаты тестирования отрицательного контроля экстракции ДНК (стерильный образец использованной питательной среды для селективного обогащения) могут быть связаны с загрязнением среды генетическим материалом тестируемого микроорганизма. В этом случае необходимо повторить

исследование с этапа селективного обогащения с применением сред, не содержащих ДНК искомого микроорганизма, с дополнительным включением в панель в качестве отрицательного контроля выделения препарата ОКО из набора реагентов.

При оценке жизнеспособности целевого микроорганизма в пищевых продуктах сопоставляют результаты тестирования образцов, подвергавшихся и не подвергавшихся инкубации после посева на этапе пробоподготовки при оптимальной температуре для роста искомым патогенов.

Отставание сигнала по каналу JOE/HEX на 3 и более пороговых цикла (Ct) для образца, не подвергавшегося инкубации ($Ct_{не\ инк} - Ct_{инк} \geq 3$), свидетельствует о наличии в продукте жизнеспособного микроорганизма.

19. Результаты оценивают по каждой исследованной пробе отдельно.

19.1. Заключение о присутствии искомым патогенных бактерий в исследованной массе (объеме) продукта выдают при получении положительного результата ПЦР (выявлении ДНК указанных микроорганизмов в пробе) и подтверждения их жизнеспособности.

19.2. Заключение об отсутствии искомым патогенных бактерий в исследованной массе (объеме) продукта выдают при получении отрицательного результата ПЦР (невыявлении ДНК искомым микроорганизмов) при исследовании образцов пищевых продуктов, подвергнутых инкубации в питательных средах, или положительного результата ПЦР (выявлении ДНК искомым микроорганизмов в пробе), но отрицательного результата по подтверждению жизнеспособности.

19.3. Заключение об отсутствии искомым патогенных бактерий в исследованном нативном продукте, исследуемом при расследовании вспышек, при получении отрицательного результата ПЦР (невыявлении ДНК искомым микроорганизмов), не выдается.

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

Схема № 1
Комбинированная схема анализа *Salmonella spp.*

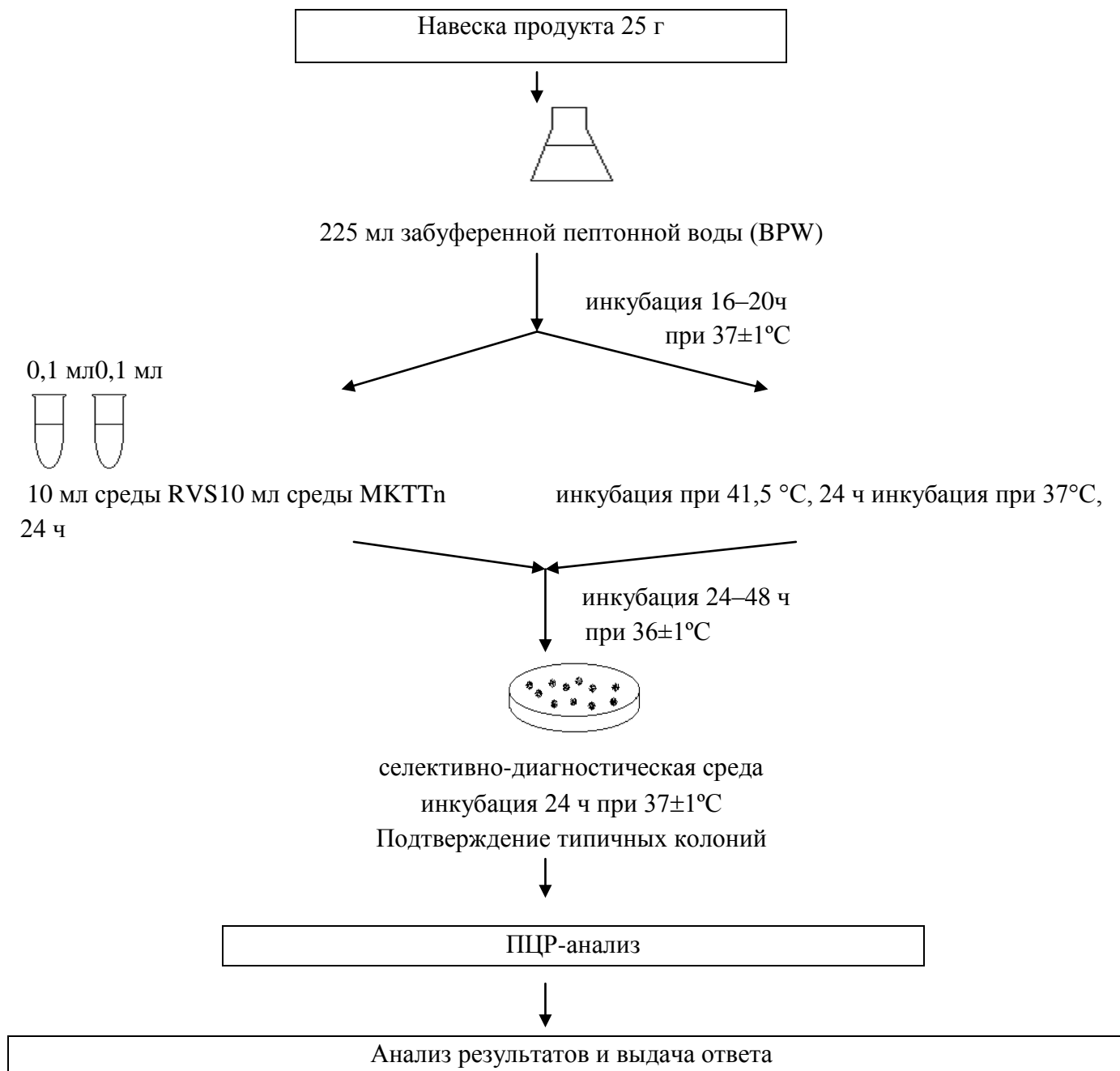


Схема № 2
Комбинированная схема анализа *Cronobacter sakazakii*

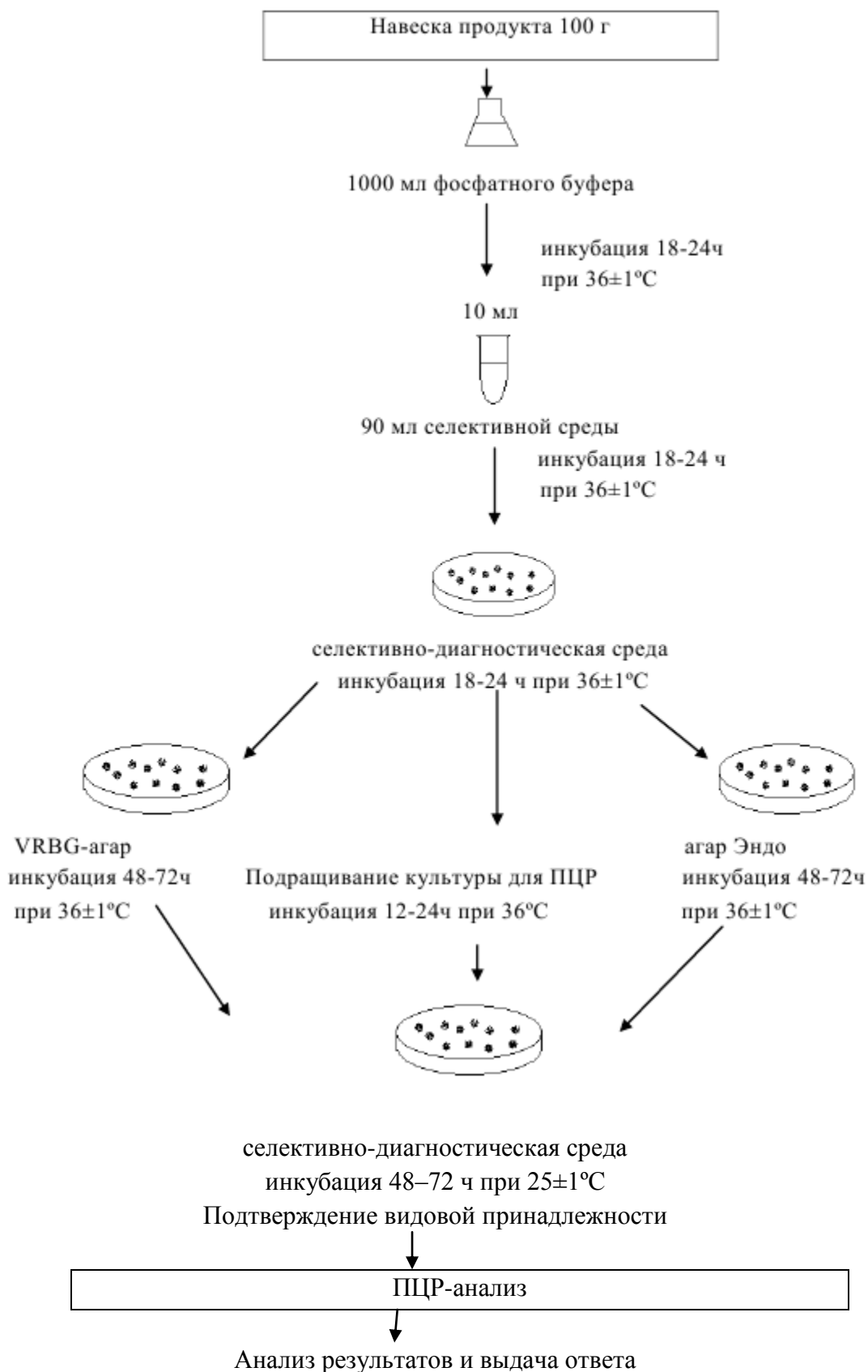


Схема № 3
Комбинированная схема анализа энтерогеморрагических *E.coli* (EHEC)

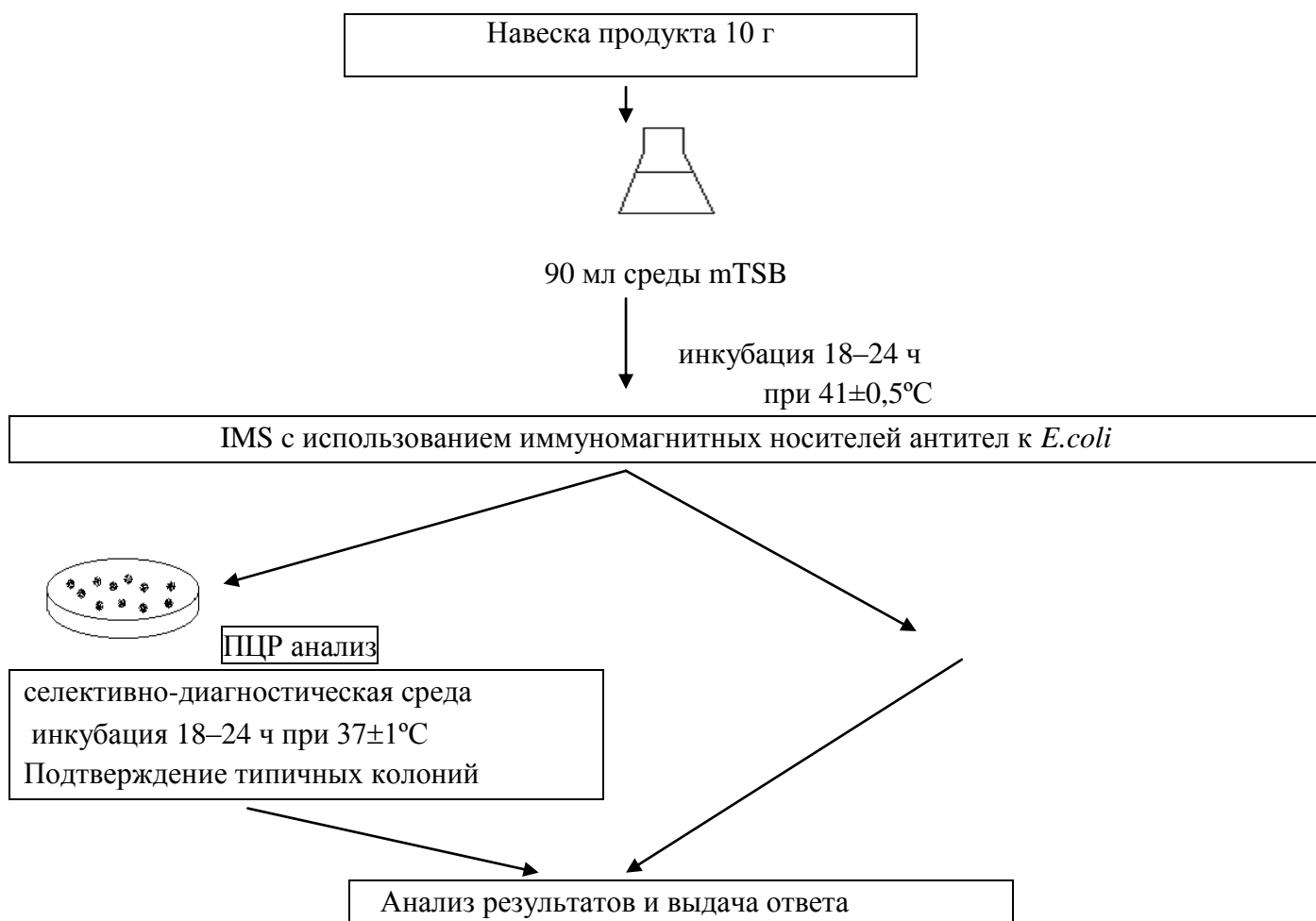
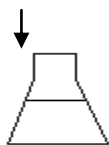


Схема № 4
Комбинированная схема анализа *Campylobacter spp.*

Навеска продукта 10г



90 мл среды первичного обогащения (бульон Болтона)

инкубация в газовой среде:

при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ — 4–6 ч;

при $41\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ — 40–48 ч



селективно-диагностическая среда

инкубация в газовой среде 40–48ч при $41\pm 0,5^{\circ}\text{C}$

Подтверждение типичных колоний



ПЦР-анализ



Анализ результатов и выдача ответа

Схема № 5
Комбинированная схема анализа *L.monocytogenes*

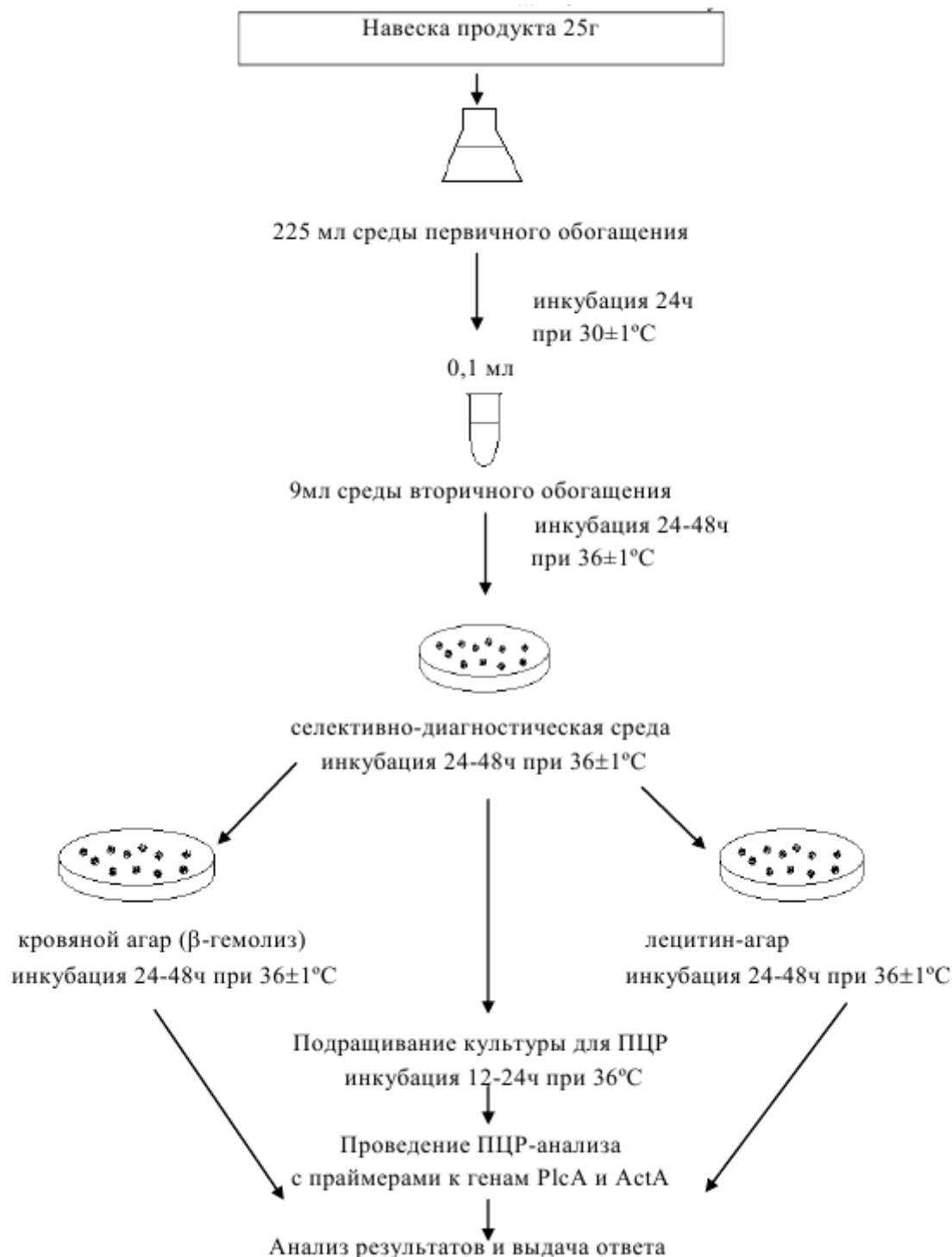
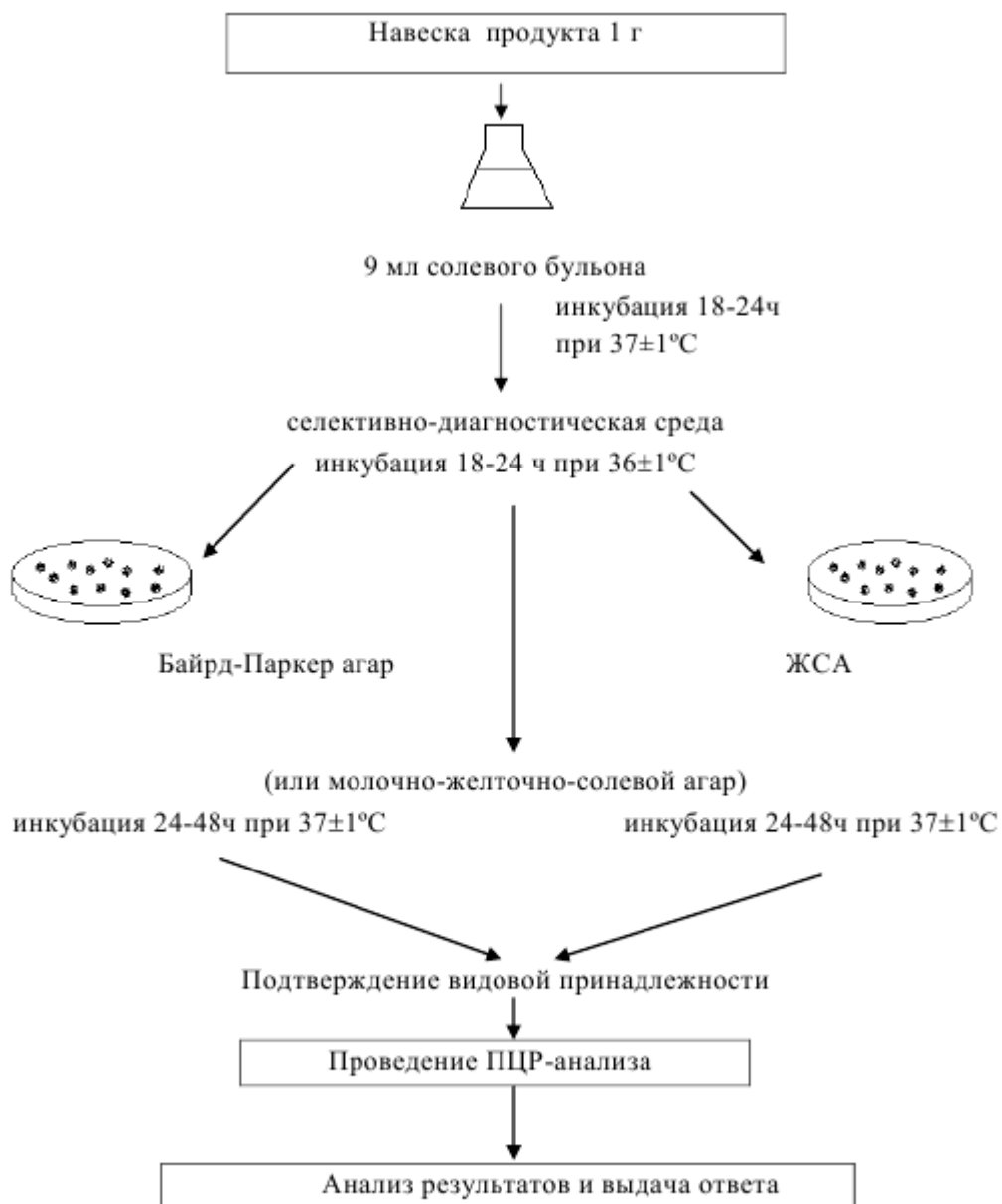


Схема № 6
Комбинированная схема анализа *S. aureus*



Валидация методов для внедрения в лабораторную практику

Валидация проводится в соответствии с требованиями СТБ П ISO 16140-2003/2010 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов» раздел 5 «Качественные методы».

Альтернативный метод (alternative): Метод анализа, обеспечивающий для объектов окружающей среды обнаружение или оценку такого же аналита, какой измеряют с помощью соответствующего стандартного метода.

Метод может быть патентованным или некоммерческим и необязательно должен включать всю процедуру анализа от приготовления образцов до отчета об испытании.

Альтернативный метод тестирования, как правило, отличается быстродействием проведения анализа и/или получения результата; простотой выполнения и/или автоматизации; аналитическими качествами (прецизионность, точность, предел обнаружения и т. д.); миниатюризацией; снижением затрат.

Стандартный метод (reference): принятый на международном уровне и широко применяемый метод.

В настоящей работе под стандартным методом подразумеваются национальные, международные и европейские стандарты:

Валидация альтернативного метода (validation of an alternative method): процедура подтверждения соответствия того, что результаты, полученные альтернативным методом, сравнимы с результатами, полученными стандартным методом. Термин «сравнимы» определяется в настоящей работе техническим протоколом, адаптированным для метода каждого типа.

Качественный метод (qualitative method): метод анализа, результатом которого является установление наличия или отсутствия аналита, обнаруживаемого прямо или косвенно в определенном количестве образца.

Сравнительное исследование методов (methods comparison study): исследование, целью которого является сравнение альтернативного метода со стандартным методом.

Общие принципы валидации и сертификации альтернативных методов — сравнительное исследование методов по показателям относительная точность, относительная специфичность и относительная чувствительность.

В настоящей работе применены следующие термины с соответствующими определениями:

Относительная точность (АС) (relative accuracy): Степень соответствия между результатом, полученным стандартным методом, и результатом, полученным альтернативным методом, при исследовании идентичных образцов. Термин «относительная точность», используемый в настоящем стандарте, является дополнительным к терминам «точность» и «правильность».

Точность — это «степень близости результата испытания и принятого опорного значения», и правильность - это «степень близости среднего значения большого числа результатов испытания и принятого опорного значения». В настоящем стандарте в качестве принятого опорного значения выбрано значение, получаемое стандартным методом.

Положительное отклонение (PD) (positive deviation): альтернативный метод «ложноположителен», когда он показывает положительное отклонение (т. е. получен положительный результат), в то время как стандартный метод дает отрицательный результат. Положительное отклонение становится ложноположительным результатом, когда можно доказать, что истинный результат отрицателен. Положительное отклонение считается «истинно положительным», когда можно доказать, что истинный результат положителен.

Отрицательное отклонение (ND) (negative deviation): альтернативный метод показывает отрицательное отклонение (т. е. получен отрицательный результат), в то время как стандартный метод дает положительный результат. Отрицательное отклонение считается «ложноотрицательным», когда можно доказать, что истинный результат положителен.

Относительная чувствительность (SE) (relative sensitivity): способность альтернативного метода обнаруживать аналит, когда его обнаруживает стандартный метод.

Относительная специфичность (SP) (relative specificity): способность альтернативного метода не обнаруживать микроорганизм тогда же, когда его не обнаруживает стандартный метод.

Для искусственно контаминированных типов пищевых продуктов подбирают уровни инокуляции таким образом, чтобы достичь частичного положительного выделения микроорганизмов в анализируемых испытательных подобразцах хотя бы одним из методов.

Желательно получить примерно 50% положительных результатов и 50% отрицательных. Это рекомендация, а не абсолютно требуемое процентное соотношение, при условии, что некоторое число испытательных подобразцов «положительно», а часть — «отрицательны» для одного и того же объекта.

Приготовление испытательных образцов

Стандартный и альтернативный методы должны быть проведены, насколько это возможно, на одном и том же образце.

В случае, когда первоначальная методология или растворы различаются, готовят парные испытательные подобразцы для анализа. Имеются два основных метода для таких процедур приготовления:

В первом случае смешивают двойную навеску образца с равной по весу или объему навеской стерильной воды или другого подходящего разбавителя и тщательно гомогенизируют. Затем разделяют ее на два подобразца, обращая особое внимание на увеличение концентрации первичного обогащения примерно на 10% для компенсации эффекта разбавления разбавленного гомогенизированного образца.

Во втором случае непосредственно контаминируют образец поллютантом в количестве, достаточном для выявления поллютанта из анализируемых испытательных подобразцов хотя бы одним методом.

Используются следующие критерии:

Относительная точность

$$AC = \frac{PA}{NA} 100\%$$

Относительная специфичность

$$SP = \frac{NA}{N^-} 100\%$$

Относительная чувствительность:

$$SE = \frac{PA}{N^+} 100\%$$

где N — суммарное число образцов (NA + PA + PD + ND);

PD — положительное отклонение;

ND — отрицательное отклонение;

NA — отрицательное согласование;

PA — положительное согласование;

N⁻ — суммарное число отрицательных результатов для стандартного метода (NA + PD);

N⁺ — суммарное число положительных результатов для стандартного метода (PA + ND).

Интерпретация результатов

На основании числа положительных отклонений и числа отрицательных отклонений, оценивают возможность альтернативного метода получать большее или меньшее число истинно положительных результатов, чем стандартным методом.