

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь



С.В.Нечай

2024 г.

Регистрационный № *0001-1122*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ
ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В СРЕДЕ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОКРУЖЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены,
эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ:

д.б.н., профессор Дудчик Н.В., Науменко С.А., к.б.н. Емельянова О.А.,
к.м.н., доцент Тонко О.В., д.м.н., профессор Коломиец Н.Д.

Минск, 2024

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее – Инструкция) изложены молекулярно-генетические экспресс-методы качественного выявления патогенных микроорганизмов рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes* в смывах с поверхностей объектов технологического окружения пищевых производств.

Методы могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний населения, ассоциированных с патогенными микроорганизмами рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes*, для контроля соблюдения гигиенического норматива, устанавливающего санитарно-эпидемиологические требования к допустимому уровню патогенных микроорганизмов на поверхностях, контактирующих с готовыми к употреблению пищевыми продуктами.

Данные методы позволят реализовывать производственный контроль наличия патогенных микроорганизмов на объектах технологического окружения пищевых производств при изготовлении, реализации, хранении, транспортировке продовольственного сырья и (или) пищевых продуктов с целью мониторинга.

2. Настоящая Инструкция предназначена для специалистов органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор и иных организаций здравоохранения, государственных учреждений образования, осуществляющих подготовку, повышение квалификации и (или) переподготовку специалистов с высшим или средним специальным медицинским образованием.

3. Настоящая Инструкция вступает в силу с даты ее утверждения.

ГЛАВА 2 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4. Молекулярно-генетические экспресс-методы выявления патогенных микроорганизмов рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes* в смывах с поверхностей объектов технологического окружения пищевых производств предусматривают взятие смывов с поверхностей объектов производственной среды пищевых производств, культивирование отобранных смывов в накопительных питательных средах, экстракцию (выделение) ДНК из культуральной жидкости, амплификацию специфических участков ДНК целевых бактерий со специфичными праймерами и гибридизационно-флуоресцентную детекцию ампликонов, осуществляемую в режиме «реального времени» в ходе ПЦР.

5. Принципом методов является качественное выявление последовательностей (фрагментов) ДНК, строго специфических для геномов бактерий рода *Salmonella*, вида *Listeria monocytogenes* и оценка жизнеспособности присутствующих в исследуемом смыве целевых микроорганизмов путем сопоставления результата ПЦР-анализа парных аликвот пробы, прошедших культуральное обогащение в течение (2 ± 1) ч и (20 ± 2) ч в одном исследовании.

ГЛАВА 3 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

6. Для молекулярно-генетических экспресс-методов выявления патогенных микроорганизмов рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes* в смывах с поверхностей объектов технологического окружения пищевых производств используется следующее оборудование, материалы, питательные среды, реагенты:

ОБОРУДОВАНИЕ

Нормативная
документация

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

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

pH-метр с точностью калибровки $\pm 0,1$ ед. pH при температуре 25 °C

ГОСТ ISO7218
(подраздел 4.4)

Весы лабораторные общего назначения (для взвешивания реактивов) с пределом допустимой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более $\pm 0,01$ мг

ГОСТ 24104-2001

Весы лабораторные общего назначения (для взвешивания смыва) с пределом допустимой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 20 мг

ГОСТ 24104-2001

Термометр стеклянный, с ценой деления шкалы 1,0 °C

Термогигрометр с диапазоном измерений: относительной влажности от 0 % до 98 %; температуры от минус 20 °C до 60 °C или термометр, барометр

Автоматические дозаторы с переменным объемом дозирования (от 2 до 20 мкл с шагом 0,1 мкл, от 20 до 200 мкл с шагом 1 мкл, от 100 до 1000 мкл с шагом 5 мкл)	
Аппарат для сухой стерилизации (стерилизационный сушильный шкаф)	ГОСТ ISO7218 (подраздел 4.6)
Аппарат для влажной стерилизации (автоклав)	
Термостат, поддерживающий температуру (30±1) °С	ГОСТ ISO7218 (подраздел 4.6)
Термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С	ГОСТ ISO7218 (подраздел 4.6)
Дистиллятор	ГОСТ 6709
Устройство для перемешивания жидкости в колбах и пробирках, пакетах	
Лабораторная центрифуга для пробирок с максимальной скоростью центрифугирования не менее 6000 об/минуту)	
Центрифуга для пробирок типа эппендорф с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12000 об/минуту)	
Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) или ламинарный бокс/шкаф класса биологической безопасности II	
Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости	
Облучатель бактерицидный	
Термостат для пробирок типа эппендорф вместимостью 1,5 см ³ , диапазон температур от 15,0 до 120,0 °С	
Холодильник от 2,0 °С до 8,0 °С с морозильной камерой от минус 20 °С до минус 16 °С для хранения выделенных проб ДНК	СТБ 1499-2004
Электроплиты, электроплитки	ГОСТ 14919-83
МАТЕРИАЛЫ	
Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР в реальном времени:	
а) на 0,2 см ³ (плоская крышка, нестрипованные, для постановки в ротор на 36 пробирок) – для приборов с детекцией через дно пробирки;	
б) на 0,2 см ³ (куполообразная крышка – для приборов с детекцией через крышку)	

Наконечники одноразовые с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл
Халаты, шапочки, маски, обувь или бахилы, одноразовые перчатки латексные неопудренные

Пинцет медицинский

Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ стерильные одноразового применения

Пробирки бактериологическиетипов П1 и П2

ГОСТ 1770-74
(ИСО 1042-83,
ИСО 4788-80)

Пробирки типа эппендорф вместимостью 0,2, 0,5 и 1,5 см³

Спиртовки лабораторные стеклянные

Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100, 200, 500 см³

Системы для взятия смывов (стерильный тампон/губка/салфетка/ткань и др.)

Стерильный одноразовый или многоразовый шаблон/графарет, охватывающий определенную область для взятия смывов

Вата медицинская гигроскопичная

ГОСТ 5556-81

Марля медицинская

ГОСТ 9412-93

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, РЕАКТИВЫ

Комплект реагентов (набор) для экстракции ДНК

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 *Salmonella spp*, содержащие:

- смеси олигонуклеотидных праймеров на участки ДНК бактерий и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам амплифицируемых ДНК-мишеней;
- полимеразу (TaqF);
- смесь буфера и нуклеозидтрифосфатов;
- ДНК-буфер;
- положительные контрольные образцы этапа

ПЦР со специфическими фрагментами ДНК
искомых микроорганизмов и внутренним
контрольным образцом;

- отрицательный контрольный образец и
внутренний неконкурентный контрольный
образец этапа выделения;
- минеральное масло для ПЦР силика магнитная
в растворе для автоматизированной экстракции
ДНК, буфер лизирующий для
автоматизированной экстракции ДНК

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, *Listeria monocytogenes*,
содержащие:

- смеси олигонуклеотидных праймеров на
участки ДНК бактерий и флуоресцентно-меченых
олигонуклеотидных зондов, комплементарных
участкам амплифицируемых ДНК-мишеней;
- полимеразу (TaqF);
- смесь буфера и нуклеозидтрифосфатов;
- ДНК-буфер;
- положительные контрольные образцы этапа
ПЦР со специфическими фрагментами ДНК
искомых микроорганизмов и внутренним
контрольным образцом;
- отрицательный контрольный образец и
внутренний неконкурентный контрольный
образец этапа выделения

Натрий хлористый (NaCl)

Пептон

Полуконцентрированный бульон Фрайзера

Забуференная пептонная вода

Селенитовый бульон

Вода дистиллированная

Спирт этиловый

ГОСТ 6709

ГОСТ 5962-67

7. Допускается применение оборудования и материалов с
аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а

также коммерческих питательных сред, комплектов (наборов) реагентов и систем идентификации для проведения испытаний, готовых коммерческих материалов для отбора смывов. При использовании питательных сред отечественного производства, выработанных по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке и импортного производства с международным сертификатом качества ИСО 9000 или EN 29000, следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. При использовании реактивов (наборов) для проведения ПЦР исследования следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 4 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ

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

9. Растворители для выделения ДНК.

9.1. Физиологический раствор

Состав:

натрий хлористый (NaCl), г	8,5
дистиллированная вода, см ³	1000

Приготовление:

Натрий хлористый растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют при температуре (121,0±1,0) °С в течение 15 мин.

9.2 Фосфатно-солевой буферный раствор

Состав:

однозамещенный фосфорнокислый калий безводный (KH ₂ PO ₄), г	0,45
двухзамещенный фосфорнокислый натрий безводный (Na ₂ HPO ₄), г	5,34
натрий хлористый (NaCl), г	9,0
дистиллированная вода, см ³	1000

Приготовление:

Компоненты растворяют в дистиллированной воде. При необходимости устанавливают рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,2±0,1) ед. рН при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121,0 °С в течение 15 мин.

10. Среды для взятия смывов.

10.1 Пептонный солевой раствор

Состав:

пептон, г	1
натрий хлористый (NaCl), г	8,5
дистиллированная вода, см ³	1000

Приготовление:

Компоненты растворяют в дистиллированной воде. При необходимости устанавливают рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,0±0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

10.2 Раствор пептона 0,1 %

Состав

пептон, г	1
дистиллированная вода, см ³	1000

Приготовление:

Пептон растворяют в дистиллированной воде. При необходимости устанавливают рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,0± 0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

11. Нейтрализатор

В точках отбора, где возможны остаточные количества дезинфицирующих средств, а также когда отбор проб осуществляется после дезинфекции, используют в качестве среды для отбора проб *нейтрализатор*, который добавляют к средам для взятия смывов (п. 10.1 и п. 10.2) перед стерилизацией в автоклаве.

Примерный перечень нейтрализаторов приведен в Приложении 1.

12. Полуконцентрированный бульон Фрайзера для обогащения бактерий вида *Listeria monocytogenes*:

Основа среды:

ферментативный гидролизат казеина, г	5,0
пептон, г	5,0
мясной экстракт, г	5,0
дрожжевой экстракт, г	5,0
натрий хлористый, г	20,0
однозамещенный фосфорнокислый калий безводный (KH ₂ PO ₄), г	1,35
двухзамещенный фосфорнокислый натрий безводный (Na ₂ HPO ₄), г	12,0
эскулин, г	1,0
дистиллированная вода, см ³	1000

Приготовление:

Растворяют компоненты в дистиллированной воде, нагревая при необходимости. Устанавливают рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало $(7,0 \pm 0,2)$ ед. рН при температуре 25 °С. Разливают основу среды во флаконы и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Растворы селективных добавок:

Раствор хлорида лития

Состав:

хлорид лития, г	3,0
дистиллированная вода, см ³	10,0

Приготовление:

Хлорид лития растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

Предупреждение – Необходимо принимать все меры предосторожности при растворении хлорида лития в воде, так как реакция является экзотермической. Раствор хлорида лития раздражает слизистую оболочку.

Раствор натриевой соли налидиксовой кислоты:

Состав:

натриевая соль налидиксовой кислоты, г	0,1
0,05 моль/дм ³ раствора гидроксида натрия, см ³	10,0

Приготовление:

Натриевую соль налидиксовой кислоты растворяют в растворе гидроксида натрия и стерилизуют раствор путем фильтрования

Раствор акрифлавина гидрохлорида:

Состав:

акрифлавин гидрохлорид, г	0,25
дистиллированная вода, см ³	100

Приготовление:

Акрифлавин гидрохлорида растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

Раствор цитрата аммонийного железа (III)

Состав:

цитрат аммонийного железа (III), г	5,0
дистиллированная вода, см ³	100

Приготовление:

Цитрат аммонийного железа (III), растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

Готовая среда

Состав среды:

основа среды, см ³	100
раствор хлорида лития, см ³	1,0
раствор натриевой соли налидиксовой кислоты, см ³	0,1
раствор акрифлавина гидрохлорида, см ³	0,5
раствор цитрата аммонийного железа (III)	1,0

Приготовление:

В основу среды добавляют четыре раствора селективных добавок непосредственно перед использованием.

Готовые коммерческие среды готовят согласно инструкции производителя.

13. Среда для обогащения бактерий *рода Salmonella*:

13.1 Забуференная пептонная вода

Состав:

пептон, г	10
натрий хлористый (NaCl), г	5
двузамещенный фосфорнокислый натрий 12-водный (Na ₂ HPO ₄ -12 H ₂ O), г	9,0
однозамещенный фосфорнокислый калий (KH ₂ PO ₄), г	1,5
дистиллированная вода, см ³	1000

Приготовление:

Компоненты растворяют в дистиллированной воде. При необходимости устанавливают рН так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,0± 0,2) ед. рН при температуре 25 °С. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Готовые коммерческие среды готовят согласно инструкции производителя.

13.2 Селенитовая среда

Состав:

пептон, г	5
натрий хлористый (NaCl), г	5
двузамещенный фосфорнокислый натрий безводный, г	7,0
однозамещенный фосфорнокислый натрий, г	3,0

лактоза, г	3,0
натрия гидроселенит,	4,0
дистиллированная вода, см ³	1000

Компоненты растворяют в дистиллированной воде и нагревают до кипения. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. При необходимости устанавливают рН так, чтобы его значение соответствовало $(7,0 \pm 0,2)$ ед. рН при температуре 25 °С.

Готовые коммерческие среды готовят согласно инструкции производителя.

14. Полуконцентрированный Бульон Фрайзера, забуференную пептонную воду, селенитовую среду не следует использовать для взятия смывов, так как эти среды могут способствовать росту целевых патогенных микроорганизмов (рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes*) в месте обработки.

ГЛАВА 5 ОТБОР ПРОБ

15. Места и площади отбора проб, время и методы отбора проб, точки отбора проб выбираются на основе принципа оценки рисков.

16. Ориентировочный перечень потенциальных мест для отбора проб:

- поверхности, не контактирующие с пищевыми продуктами: стоки, полы, инструменты для очистки, зоны мойки, оборудование для взвешивания на полу, шланги, полые ролики для транспортировки, конвейеры, рамы оборудования, внутренние панели оборудования, каплеуловители конденсата, вилочные погрузчики, ручные тележки, тележки, колеса тележки, мусорные баки, морозильные камеры, льдогенераторы, охлаждающие вентиляторы в конденсаторах, фартуки, стены, потолки, холодные места, в которых образуется водный конденсат, влажная изоляция на стенах или вокруг труб, охлаждающие устройства, резиновые уплотнения вокруг двери (особенно в кулерах), пылесосы, дверные ручки и краны и др.

- поверхности, контактирующие с пищевыми продуктами / с готовыми пищевыми продуктами: конвейерные ленты, резак, разделочные доски, дозаторы, бункеры, измельчители, блендеры, очистители, сборочные машины, оборудование для наполнения и упаковки, контейнеры, другая посуда, одежда, перчатки и руки и др.

17. Площадь, с которой осуществляется отбор проб смывов с поверхностей, контактирующих с готовыми к употреблению пищевыми продуктами, устанавливается в соответствии с гигиеническим

нормативом.

Площадь, с которой осуществляется отбор проб смывов с целью мониторинга, устанавливается в соответствии с нормативно-технической документацией. Для определения патогенных микроорганизмов с целью мониторинга циркуляции патогенных микроорганизмов (рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes*) отбирают пробы с любых объектов с площади от 1000 см² до 3000 см²). Размер площади, подлежащей отбору, сохраняют неизменным для того, чтобы осуществить оценку мониторинга.

18. Если площадь объекта не может быть определена в см² (мелкие объекты, труднодоступные небольшие участки, объекты неправильной и сложной формы), указывается количество и наименование объектов, с которых отбирают смывы (например: ножи, краны, емкости, руки работников и иные объекты).

19. Отбор проб производится во время производства, но не ранее чем через два часа после начала смены или в конце производственных смены/циклов (т.е. перед очисткой и дезинфекцией) в целях увеличения вероятности обнаружения патогенных микроорганизмов рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes*.

Отбор проб в целях мониторинга может производиться во время/после производства, или после очистки и дезинфекции.

20. Отбор проб с поверхности объектов технологического окружения пищевых производств проводят в асептических условиях с использованием специально предназначенных для этих целей стерильных систем для взятия смывов, стерильных одноразовых/многократных шаблонов/трафаретов, охватывающих определенную площадь (при взятии смывов с ровной поверхности), а также сред для взятия смывов/нейтрализаторов.

20.1 При отборе смывов с влажной поверхности используют сухой тампон/губку/салфетку/ткань.

20.2 При отборе смывов с сухой поверхности используют тампон/губку/салфетку/ткань, увлажненный средой для взятия смывов/нейтрализатором.

20.3 Смывы с площади меньше или равной 10×10 см (100 см²) отбирают стерильным тампоном.

20.4 При отборе смывов с площади более 100 см² следует использовать губку/салфетку/ткань. Они обладают большей влагопоглощающей способностью и позволяют тщательно протереть исследуемую поверхность.

20.5 Смывы с мелких объектов, труднодоступных небольших участков, объектов неправильной и сложной формы, площадь которых определить невозможно, берут тампоном со всей поверхности.

20.6 После отбора проб поверхность, с которой отбирались смывы, обрабатывают дезинфицирующим средством с последующей промывкой поверхности водой и протиранием чистой салфеткой.

21. Методы отбора проб

21.1 Метод отбора смыва влажным тампоном на аппликаторе

Тампон на аппликаторе извлекают из стерильной упаковки и увлажняют наконечник тампона погружением в пробирку с 2 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора. Надавливают кончиком тампона на стенку пробирки, чтобы удалить излишек среды для взятия смыва/нейтрализатора. Помещают наконечник тампона на контролируемую поверхность и проводят смыв с оцениваемой площади, вращая аппликатор большим и указательным пальцами в двух перпендикулярных направлениях. Для плоских поверхностей отбор проб выполняют горизонтально и вертикально, по 10 раз в каждом направлении. На труднодоступных небольших поверхностях следует отбирать пробы со всей поверхности, включая щели, зазоры, поверхностные соединения и т.д. Возвращают тампон с аппликатором в пробирку со средой для взятия смыва/нейтрализатором, так чтобы тампон полностью был погружен в раствор. Проверяют, чтобы пробирка оставалась закрытой до исследования.

21.2 Метод отбора смыва сухим тампоном на аппликаторе

Сухой тампон на аппликаторе извлекают из стерильной упаковки, помещают наконечник тампона на контролируемую влажную поверхность, и проводят смыв с оцениваемой площади, вращая аппликатор большим и указательным пальцами в двух перпендикулярных направлениях. Для плоских поверхностей отбор проб выполняют горизонтально и вертикально, по 10 раз в каждом направлении. На труднодоступных небольших поверхностях следует отбирать пробы со всей поверхности, включая щели, зазоры, поверхностные соединения и т.д. Помещают тампон с аппликатором в пробирку с 2 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора, так чтобы тампон полностью был погружен в раствор. Проверяют, чтобы пробирка оставалась закрытой до исследования.

21.3 Метод отбора смыва влажной губкой /салфеткой/тканью

Открывают пластиковый пакет или контейнер с губкой или салфеткой/тканью. Асептически извлекают губку/салфетку/ткань, используя стерильный пинцет и/или стерильные перчатки, или захватывают губку/салфетку/ткань через пакет, выворачивают его наизнанку (используют как перчатку), и увлажняют погружением в пластиковый пакет или контейнер с 9 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора. Смывы с контролируемой поверхности проводят горизонтально и вертикально, используя равномерное и плотное давление,

меня стороны губки/салфетки/ткани и удостоверяются, что отбор проб проведен на всей контролируемой площади. Помещают губку/салфетку/ткань обратно в пластиковый пакет или контейнер с 9 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора и обеспечивают, чтобы губка/салфетка/ткань оставалась влажной до анализа. Закрывают пластиковый пакет или контейнер так, чтобы исключить протекание или перекрестное загрязнение.

21.4 Метод отбора смыва сухой губкой/салфеткой/тканью

Открывают пластиковый пакет или контейнер с губкой или салфеткой/тканью. Асептически извлекают губку/салфетку/ткань, используя стерильный пинцет и/или стерильные перчатки, или захватывают губку/салфетку/ткань через пакет, выворачивают его на изнанку (используют как перчатку). Смывы с выбранной поверхности проводят горизонтально и вертикально, используя равномерное и плотное давление, меняя стороны губки/салфетки/ткани, и удостоверяются, что отбор проб проведен на всей контролируемой площади. Помещают губку/салфетку/ткань в пластиковый пакет или контейнер с 9 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора, так чтобы она полностью была погружена в раствор. Закрывают пластиковый пакет или контейнер так, чтобы исключить перекрестное загрязнение.

21.5 Метод отбора смыва с рук и перчаток

Для смывов с рук используют тампоны на аппликаторах. Пробы отбираются с обеих рук. Тампон на аппликаторе извлекают из стерильной упаковки и увлажняют наконечник тампона, погружением в пробирку, содержащую 2 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора. Надавливают кончиком тампона на стенку пробирки, чтобы удалить излишек среды для взятия смыва/нейтрализатора. Помещают наконечник тампона на ладонь и тщательно протирают не менее 5 раз ладони и пальцы, затем протирают межпальцевые пространства, ногтевые ложа и подногтевые поверхности. Используют два стерильных влажных тампона на одного человека (по одному на каждую руку) Возвращают тампоны с аппликатором в пробирку с 2 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора. Проверяют чтобы тампоны полностью были погружены в раствор. С перчаток смывы берут только со стороны ладоней.

21.6 Метод отбора смыва с санитарной одежды

Смыв с санитарной одежды отбирают с помощью тампона на аппликаторе с четырех участков. Тампон на аппликаторе извлекают из стерильной упаковки и увлажняют наконечник тампона, погружением в пробирку, содержащую 2 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора. Надавливают кончиком тампона на стенку пробирки, чтобы удалить излишек среды для взятия смыва/нейтрализатора. Протирают тампоном 4 участка по 25 см²: нижнюю часть каждого рукава и две площадки с

верхней и средней частей передних пол одежды. Возвращают тампон с аппликатором в пробирку с 2 см³ среды для взятия смыва/нейтрализатора. Проверяют чтобы тампон полностью был погружен в раствор.

ГЛАВА 6 ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

22. Отобранную пробу маркируют и сопровождают документом отбора проб, где указывают всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы: номер по порядку, место взятия смыва с объекта (оборудование, инвентарь посуда доска, руки и т.д.), дату, время отбора, использованный метод отбора проб, ФИО специалиста проводившего отбор.

Транспортировку проб смывов в лабораторию осуществляют в термоконтейнерах с охлаждением.

Хранение проб осуществляется в холодильнике при температуре (3±2) °С.

23. Испытания доставленных проб проводят по возможности в кратчайшие сроки, но не более чем через 24 ч от момента отбора проб СМЫВОВ.

ГЛАВА 7 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ ВИДА *LISTERIA MONOCYTOGENES* В ПРОБЕ СМЫВА

24. Схема проведения молекулярно-генетического экспресс-метода выявления патогенных бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва приведена в Приложении 2.

25. Обогащение пробы смыва в селективной питательной среде.

Для накопления бактерий вида *L. monocytogenes* к анализируемой пробе смыва X (см³) в пробирку с тампоном или в пакет с губкой/салфеткой/тканью вносят полуконцентрированный бульон Фрайзера для селективного обогащения (п.12) в соотношении объема пробы смыва к среде 1:9.

Тщательно перемешивают содержимое пробирки с тампоном или пакета с губкой /салфеткой/тканью.

26. Подготовка парных аликвот пробы смыва.

После перемешивания, пробу смыва с селективной средой делят на равные парные аликвоты: (аликвота № 1 пробы – с тампоном или губкой/салфеткой и аликвота № 2 пробы – без).

27. Культивирование парных аликвот пробы.

Аликвоту № 1 пробы культивируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (20 ± 2) ч.

Аликвоту № 2 пробы культивируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (2 ± 1) ч, затем замораживают при температуре от минус 20 °С до минус 16 °С (допускается только однократная заморозка!).

28. Аликвоту № 2 пробы размораживают естественным способом при комнатной температуре к моменту завершения инкубации аликвоты № 1 пробы.

29. Из аликвоты № 1 удаляют тампон или губку/салфетку/ткань, предварительно их отжав. Аликвоту № 1 и аликвоту № 2 разливают по пробиркам. Центрифугируют пробирки с аликвотой № 1 пробы и аликвотой № 2 пробы в течение 10 минут с ускорением 6000 об/мин. Удаляют супернатант/надосадочную жидкость. Ресуспендируют осадок в 1 см³ стерильного физиологического раствора или фосфатно-солевого буферного раствора. Затем снова центрифугируют и удаляют супернатант. Может быть использован иной режим центрифугирования, позволяющий с достаточной эффективностью осадить клетки из суспензии.

Для экстракции ДНК ресуспендируют осадок 100 мкл стерильного физиологического раствора или фосфатно-солевого буферного раствора и отбирают весь объем взвеси парных аликвот пробы (100 мкл взвеси аликвоты № 1 пробы и 100 мкл взвеси аликвоты № 2 пробы) в пробирки эппендорф вместимостью 1,5 см³.

30. Подготовленные по п.29 парные аликвоты пробы используются для экстракции ДНК сразу после окончания пробоподготовки и хранению не подлежат.

31. Выделение (экстракция) ДНК из каждой анализируемой аликвоты пробы проводится в присутствии внутренних контрольных образцов для контроля правильности (точности) этапов выделения и амплификации ДНК.

В качестве отрицательного контроля этапа экстракции ДНК из культуральной жидкости используют стерильный образец питательной среды (п.12) для обогащения анализируемого смыва. Постановка положительного, отрицательного контроля экстракции из коммерческого набора реагентов обязательна в соответствии с инструкцией производителя.

Не допускается применение упрощенных методик экстракции ДНК на основе термокоагуляции.

32 Проведение ПЦР-анализа

32.1 ПЦР для выявления ДНК патогенных бактерий вида *Listeria monocytogenes* осуществляется с использованием программируемого амплификатора и наборов реагентов для определения ДНК *Listeria monocytogenes*, обеспечивающих постановку гибридационно-

флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме реального времени.

32.2 Постановку ПЦР для выявления ДНК бактерий вида *Listeria monocytogenes* осуществляют по схемам и алгоритмам, рекомендованным производителем комплектов реагентов с обязательным применением внутренних контрольных образцов с этапа экстракции ДНК.

33. Для оценки жизнеспособности бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва сопоставляют результаты одновременного тестирования аликвоты № 1 и аликвоты № 2.

Оценка жизнеспособности бактерий вида *Listeria monocytogenes* в анализируемых парных аликвотах пробы смыва проводится по разнице значений C_t (пороговых циклов амплификации) для парных аликвот пробы образца, регистрируемых в процессе реального времени.

Значения C_t для парных аликвот пробы образца различаются на три единицы и более ($C_{t\text{аликвота } \# 2} - C_{t\text{аликвота } \# 1} \geq 3$) свидетельствуют о наличии в пробе смыва живых (неинактивированных) клеток бактерий вида *Listeria monocytogenes* (Приложение 2).

34. Учет и интерпретация результатов

34.1 Заключение о наличии бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва с исследуемой площади объекта технологического окружения пищевых производств выдают при получении положительного результата ПЦР в одной либо двух аликвотах и при подтверждении жизнеспособности бактерий.

34.2 Заключение об отсутствии бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва с исследуемой площади объекта технологического окружения пищевых производств выдают при получении отрицательного результата ПЦР в двух аликвотах; либо при получении положительного результата ПЦР в одной (двух) аликвотах и при подтверждении нежизнеспособности бактерий.

35. Выражение (оценка) результатов

Результаты оценивают по каждой анализируемой пробе смыва отдельно.

Отмечают наличие или отсутствие бактерий вида *Listeria monocytogenes* в исследованной пробе смыва, указав поверхность в квадратных сантиметрах либо указав количество объектов с четким описанием объектов.

Оценка соответствия результатов осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническим нормативом.

ГЛАВА 8 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *SALMONELLA* В ПРОБЕ СМЫВА

36. Схема проведения молекулярно-генетического экспресс-метода выявления патогенных бактерий рода *Salmonella* в пробе смыва приведена в Приложении 3.

37. Обогащение пробы смыва в селективной питательной среде.

Для накопления бактерий рода *Salmonella* к анализируемой пробе смыва X (см^3) в пробирку с тампоном или в пакет с губкой/салфеткой/тканью вносят забуференную пептонную воду или селенитовый бульон для селективного обогащения (п.13.1, п. 13.2) в соотношении объема пробы смыва к среде 1:9.

Тщательно перемешивают содержимое пробирки с тампоном или пакета с губкой /салфеткой/тканью.

38. Подготовка парных аликвот пробы смыва.

После перемешивания, пробу смыва с селективной средой делят на равные парные аликвоты: (аликвота № 1 пробы – с тампоном или губкой/салфеткой/тканью и аликвота № 2 пробы – без).

39. Культивирование парных аликвот пробы

Аликвоту № 1 пробы культивируют при температуре (37 ± 1) °C в течение (20 ± 2) ч.

Аликвоту № 2 пробы культивируют при температуре (37 ± 1) °C в течение (2 ± 1) ч, затем замораживают при температуре от минус 20 °C до минус 16 °C (допускается только однократная заморозка!).

40. Аликвоту № 2 пробы размораживают естественным способом при комнатной температуре к моменту завершения инкубации аликвоты № 1 пробы.

41. Из аликвоты № 1 удаляют тампон или губку/салфетку/ткань, предварительно их отжав. Аликвоту № 1 и аликвоту № 2 разливают по пробиркам. Центрифугируют пробирки с аликвотой № 1 пробы и аликвотой № 2 пробы в течение 10 минут с ускорением 6000 об/мин. Удаляют супернатант/надосадочную жидкость. Ресуспендируют осадок в 1 см^3 стерильного физиологического раствора или фосфатно-солевого буферного раствора. Затем снова центрифугируют и удаляют супернатант. Может быть использован иной режим центрифугирования, позволяющий с достаточной эффективностью осадить клетки из суспензии.

Для экстракции ДНК ресуспендируют осадок 100 мкл стерильного физиологического раствора или фосфатно-солевого буферного раствора и отбирают весь объем взвеси парных аликвот пробы (100 мкл взвеси аликвоты № 1 пробы и 100 мкл взвеси аликвоты № 2 пробы) в пробирки эппендорф вместимостью $1,5 \text{ см}^3$.

42. Подготовленные по п.41 парные аликвоты пробы используются для экстракции ДНК сразу после окончания пробоподготовки и хранению не подлежат.

43. Выделение (экстракция) ДНК из каждой анализируемой аликвоты пробы проводится в присутствии внутренних контрольных образцов для контроля правильности (точности) этапов выделения и амплификации ДНК.

В качестве отрицательного контроля этапа экстракции ДНК из культуральной жидкости используют стерильный образец питательной среды (п.13.1, п.13.2) для обогащения анализируемого смыва. Постановка положительного, отрицательного контроля экстракции из коммерческого набора реагентов обязательна в соответствии с инструкцией производителя.

Не допускается применение упрощенных методик экстракции ДНК на основе термокоагуляции.

44. Проведение ПЦР-анализа

44.1 ПЦР для выявления ДНК бактерий рода *Salmonella* осуществляется с использованием программируемого амплификатора и наборов реагентов для определения ДНК бактерий рода *Salmonella*, обеспечивающих постановку гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме реального времени.

44.2 Постановку ПЦР для выявления ДНК бактерий рода *Salmonella* осуществляют по схемам и алгоритмам, рекомендованным производителем комплектов реагентов с обязательным применением внутренних контрольных образцов с этапа экстракции ДНК.

45. Для оценки жизнеспособности бактерий рода *Salmonella* в пробе смыва сопоставляют результаты одновременного тестирования аликвоты № 1 и аликвоты № 2.

Оценка жизнеспособности бактерий рода *Salmonella* в анализируемых парных аликвотах пробы смыва проводится по разнице значений C_t (пороговых циклов амплификации) для парных аликвот пробы образца, регистрируемых в процессе реального времени.

Значения C_t для парных аликвот пробы образца различаются на три единицы и более ($C_{t\text{аликвота № 2}} - C_{t\text{аликвота № 1}} \geq 3$) свидетельствуют о наличии в пробе смыва живых (неинактивированных) клеток бактерий рода *Salmonella* (Приложение 3).

46. Учет и интерпретация результатов

46.1 Заключение о наличии бактерий рода *Salmonella* в пробе смыва с исследуемой площади объекта технологического окружения пищевых производств выдают при получении положительного результата ПЦР в одной либо двух аликвотах и при подтверждении жизнеспособности бактерий.

46.2 Заключение об отсутствии бактерий рода *Salmonella* в пробе смыва с исследуемой площади объекта технологического окружения пищевых производств выдают при получении отрицательного результата

ПЦР в двух аликвотах; либо при получении положительного результата ПЦР в одной (двух) аликвотах и при подтверждении нежизнеспособности бактерий.

47. Выражение (оценка) результатов

Результаты оценивают по каждой анализируемой пробе смыва отдельно.

Отмечают наличие или отсутствие бактерий рода *Salmonella* в исследованной пробе смыва, указав поверхность в квадратных сантиметрах либо указав количество объектов с четким описанием объектов.

Оценка соответствия результатов осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническим нормативом.

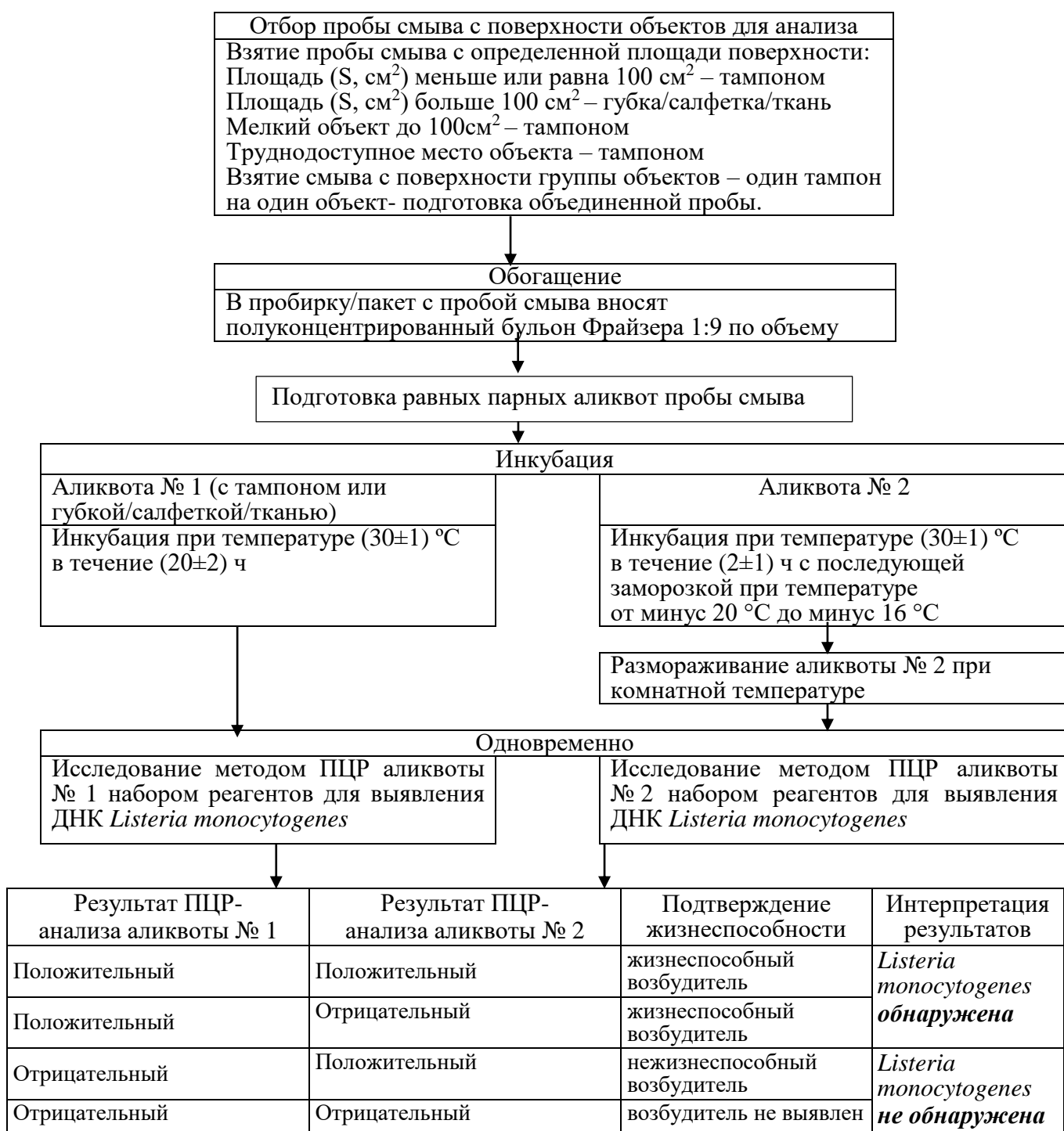
Приложение 1
к Инструкции по применению
«Молекулярно-генетические
экспресс-методы выявления
патогенных микроорганизмов в
среде технологического окружения
пищевых производств»
(Обязательное)

Примерный перечень нейтрализаторов остаточной антимикробной активности химических дезинфицирующих средств и антисептиков

Антимикробный препарат	Химические соединения, способные нейтрализовать остаточную антимикробную активность	Примеры подходящих нейтрализаторов
Четвертичные соединения аммония и жирные амины	Лецитин, сапонин, полисорбат 80, додецилсульфат натрия, (неионные поверхностно-активные вещества)	- Полисорбат 80, 30 г/л + сапонин, 30 г/л + лецитин, 3 г/л. - Полисорбат 80, 30 г/л + натрия додецилсульфат, 4 г/л + лецитин, 3 г/л.
Бигуаниды и подобные соединения	Лецитин, сапонин, полисорбат 80	- Полисорбат 80, 30 г/л + сапонин, 30 г/л + лецитин, 3 г/л.
Окисляющие соединения (хлор, йод, перекись водорода, перуксусная кислота, гипохлориты и т.д)	Тиосульфат натрия, каталаза или пероксидаза [для пероксида водорода или продуктов, высвобождающих перекись водорода]	-Тиосульфат натрия, от 3 г/л до 20 г/л + полисорбат 80, 30 г/л + лецитин, 3 г/л. -Полисорбат 80, 50 г/л + каталаза 0,25 г/л + лецитин 10 г/л.
Альдегиды	L-гистидин или глицин	- Полисорбат 80, 30 г/л + лецитин, 3 г/л + L-гистидин, 1 г/л (или + глицин, 1 г/л). - Полисорбат 80, 30 г/л + сапонин, 30 г/л + L-гистидин. 1 г/л (или + глицин, 1 г/л).
Фенольные и родственные соединения: ортофенилфенол, феноксиэтанол, триклозан, фенилэтанол и т.д. Анилиды	Лецитин, полисорбат 80	-Полисорбат 80, 30 г/л + лецитин, 3 г/л.
Спирты	Лецитин, сапонин, полисорбат 80	- Полисорбат 80, 30 г/л + сапонин, 30 г/л + лецитин, 3 г/л.
Ртутные соединения	Тиогликолят натрия	- Тиогликолят натрия от 0,5 г/л до 5 г/л.

Приложение 2
к Инструкции по применению
«Молекулярно-генетические
экспресс-методы выявления
патогенных микроорганизмов в
среде технологического окружения
пищевых производств
Обязательное

Молекулярно-генетический экспресс-метод выявления бактерий вида
Listeria monocytogenes в пробе смыва с объектов технологического
окружения пищевых производств



Приложение 3
к Инструкции по применению
«Молекулярно-генетические
экспресс-методы выявления
патогенных микроорганизмов в
среде технологического окружения
пищевых производств
Обязательное

Молекулярно-генетический экспресс-метод выявления бактерий рода
Salmonella в пробе смыва с объектов технологического окружения
пищевых производств

