

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека**

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Метод выявления и определения бактерий
Listeria monocytogenes в молоке и
молочных продуктах на основе
гибридизационного ДНК-РНК анализа**

**Дополнение 1 к МУК 4.2.1955—05
«Метод выявления и определения бактерий
рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* на основе
гибридизационного ДНК-РНК анализа»**

**Методические указания
МУК 4.2.2788—10**

ББК 51.23

М54

М54 **Метод** выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке и молочных продуктах на основе гибридного ДНК-РНК анализа: Методические указания. —М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—12 с.

1. Разработаны ГУ Научно-исследовательским институтом питания РАМН (С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, И. Б. Быкова, И. М. Нитяга); ГУ Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН (В. Г. Нестеренко); при участии фирмы ООО «Ниармедик плюс» (Т. Б. Макарова, Д. Л. Хрульков, В. В. Милитицкий, А. Б. Швецов).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 14.10.2010 № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 6 декабря 2010 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.23

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 01.02.11

Формат 60x88/16

Тираж 200 экз.

Печ. л. 0,75

Заказ 20

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2011

© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

6 декабря 2010 г.

Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Метод выявления и определения бактерий
Listeria monocytogenes в молоке и молочных продуктах
на основе гибридизационного ДНК-РНК анализа**

Дополнение 1 к МУК 4.2.1955—05

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

**Методические указания
МУК 4.2.2788—10**

Внести дополнения в МУК 4.2.1955—05:

1. Раздел 2. «Общие положения и область применения» дополнить пунктами 2.7 и 2.8 следующего содержания:

2.7. Настоящие методические указания устанавливают также метод ускоренного выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке и молочных продуктах на основе твердофазного гетерогенного гибридизационного ДНК-РНК анализа с хемиллюминесцентным детектированием. Метод может применяться в качестве дополнительного к классическим бактериологическим методам лабораторных исследований для целей выявления бактерий *Listeria monocytogenes* при контроле пищевых продуктов.

2.8. Метод ускоренного выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке и молочных продуктах предусматривает определение наличия

или отсутствия указанных микроорганизмов в определенной массе (объеме) продукта в соответствии с нормативами СанПиН 2.3.2.1078—2001 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», выраженными в альтернативной форме и основанными на существующей системе отбора образцов и оценки результатов анализа по двухклассной системе.

2. Раздел 3. «Сущность метода» дополнить пунктами 3.6, 3.7 и 3.8 следующего содержания:

3.6. Метод выявления бактерий *Listeria monocytogenes* предусматривает высеив определенных количеств исследуемых образцов молока и молочных продуктов в специальную селективную питательную среду, инкубирование посевов для накопления микроорганизмов, обработку культуральной жидкости лизирующим буфером, денатурацию бактериальной рибосомальной РНК, гибридизацию фрагментов денатурированной рРНК с комплементарным ей меченым зондом, входящим в набор «Люмипроб-24 *Listeria monocytogenes*», хемиллюминесцентным детектированием продуктов реакции.

3.7. При обнаружении положительных результатов присутствие бактерий *Listeria monocytogenes* должно подтверждаться в соответствии с методами ГОСТ Р 51921—2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*» или МУК 4.2.1122—02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах».

3.8. Мишенью в реакции ДНК-РНК гибридизации для *Listeria monocytogenes* является последовательность ДНК, кодирующая токсический белок листериолизин-О – основной фактор патогенности *Listeria monocytogenes*.

3. Раздел 10. «Нормативные ссылки» дополнить пунктом 10.19 следующего содержания:

10.19. МУК 4.2.1955—05 «Метод выявления и определения бактерий рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* на основе гибридизационного ДНК-РНК анализа».

4. Методические указания дополнить разделом 11 с названием «Проведение анализа по обнаружению бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке и молочных продуктах» следующего содержания:

11. Проведение анализа по обнаружению бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке и молочных продуктах

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

11.1.1. Аппаратура и инструментарий

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH $\pm 0,01$	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру $(160 \pm 5) ^\circ\text{C}$	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру $37 ^\circ\text{C}$ с отклонением от заданной $\pm 1 ^\circ\text{C}$	ТУ 64-1-1382—83
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру $41,5 ^\circ\text{C}$ с отклонением от заданной $\pm 1 ^\circ\text{C}$	ТУ 64-1-1382—83
Баня водяная с подогревом $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$	ГОСТ 12026—76
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру от 0 до $100 ^\circ\text{C}$	ТУ 42-22-608—75
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБР-1, МБР-3, МБС	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды по ГОСТ 6709—72	
Гомогенизатор перистальтического типа «Микс-2», «Стомайкер» или других наименований AES Lab., Cat. N AESAP 1066	
Гомогенизатор типа «вортекс»	
Штатив для 12 мм пробирок с держателем Europrobe, Cat. N P08363086	
Микропипетки на 100—1 000 мкл ВЮНИТ, Cat. N 725070 или «Ленпипет»	
Мультистеппер ВЮНИТ, Cat. N 730101	
Диспенсер ВЮНИТ, Cat. N 723046	
Распределительная емкость – объем 1,0—2,5 л ВЮНИТ	

Люминометр для пробирок «Люмлайт» или «Люмлайт мини» Euforgrobe, Cat. N EBLL01	
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ-16-535—84
Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 16317—87
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145—84
Электроплитка	ГОСТ 14919—83
Аппарат универсальный для встряхивания жидкости в колбах и пробирках (или другая аппаратура для встряхивания)	ТУ 64-1-2451—78

11.1.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см ³	ГОСТ 29227—91
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932—90
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С (цена деления шкалы 1 °С)	ГОСТ 13646—68
Чашки биологические (Петри) или одноразовые из полимерных материалов	ГОСТ 23932—90
Пакеты стерильные для гомогенизатора AES Lab., Cat. N AES400/50G	
Отраслевой стандарт для визуальной оценки мутности № 10 ГИСК им. Л. А. Тарасевича, МЗ РФ	
Денситометр для бактериальных суспензий типа «Densi-La-Meter» или «Денсимат», ф. «Ляхема», «BioMerieux»	
Стандарт Макфарланда №№ 1, 2, 3 ф. «BioMerieux»	
Петля бактериологическая, калиброванная на 1 мкл AES Lab., Cat. N AESD1100	

11.1.3. Реактивы и питательные среды

Broth RM L «Europrobe», (Ref. EB 2157, EB 21502, EB 21504)

Тест-система «Lumiprobe 24 *Listeria monocytogenes*» «Europrobe», (Ref. 11055)

Тест-штамм *Listeria monocytogenes*, типичный по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам, ГИСК им. Л. А. Тарасевича

11.1.4. Набор для проведения твердофазного гибридизационного ДНК-РНК анализа

Набор «Lumiprobe 24 *Listeria monocytogenes*» на 50 тестов в составе:

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

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

Питательные среды и биологические препараты отечественного и зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000. Питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

11.2. Подготовка к анализу

11.2.1. Приготовление растворов и реактивов

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

2. Стерильный фосфатный буфер с pH $7,2 \pm 0,1$ KH_2PO_4 – 0,45 г, Na_2HPO_4 – 5,34 г в 1 000 см³ дистиллированной H_2O , стерилизовать при температуре 121 °С в течение 30 мин.

11.2.2. Приготовление питательных сред

Приготовление среды RM L Broth: навеску 52 г растворяют в 1 000 см³ дистиллированной воды, осторожно перемешивают до растворения (при необходимости немного подогревают), устанавливают рН 7,2 ± 0,2 при 25 °С и автоклавируют при 115 °С в течение 15 мин. Простерилизованную горячую среду (70—80) °С быстро охлаждают до температуры 10—12 °С в холодной воде. Готовую среду хранят при температуре не выше 8 °С в течение 14 дней.

11.3. Подготовка к проведению твердофазного гибридационного ДНК-РНК анализа

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

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

11.3.3. Приготовление промывочного буфера: 1 флакон, содержащий 30 мл концентрированного (×20) промывочного буфера, вносят в 570 см³ свежеприготовленной стерильной дистиллированной воды (или 1 объем концентрированного буфера на 19 объемов стерильной дистиллированной воды). Приготовление буфера рекомендуется проводить в мерном цилиндре: сначала количественно переносят содержимое флакона с концентрированным буфером, после чего постепенно по стенке цилиндра вливают дистиллированную воду, доводя общий объем до 600 см³, и тщательно перемешивают, избегая образования пены на поверхности смеси. Хранение готового буфера: 1 месяц при комнатной температуре.

Примечания.

- Содержимое гибридационного буфера является едким веществом, и не должно попадать в глаза и на кожу. В случае контакта немедленно обильно промыть и обратиться к врачу.
- При проведении анализа необходимо надеть защитную одежду и перчатки.
- Большинство реагентов содержат азид натрия в качестве консерванта.

11.4. Отбор и подготовка проб к анализу

11.4.1. Общие положения по отбору и подготовке проб

Отбор и подготовку проб продукции производят в соответствии с ГОСТ 26668—85 «Методы отбора проб для микробиологических анализов», ГОСТ 26669—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов», МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов», ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218—96), ГОСТ Р 51921—2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*», МУК 4.2.1122—02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах», ГОСТ 3622—68 «Молоко и молочные продукты. Отбор и подготовка их к испытанию» и ГОСТ 9225—84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа».

11.4.2. Кисло-молочные продукты и сыры тщательно измельчают с помощью гомогенизаторов перистальтического типа или ножевых и подвергают нейтрализации до $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ 1N раствором NaOH. Топленое масло или молочный жир расплавляют при температуре 40—45 °С и перемешивают до получения однородной эмульсии, масло сливочное и мороженое расплавляют до сметанообразной консистенции.

11.5. Проведение анализа по обнаружению бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке и молочных продуктах

11.5.1. Подготовленную в соответствии с разделом 5 пробу исследуемого продукта (гомогената) вносят в среду накопления – обогатительный бульон RM L по п. 4.2, предварительно прогревом в течение 15 мин при температуре 45 °С, для первичного обогащения в соотношении 1 : 3 (25 г продукта в 75 см³ среды). При необходимости анализа других масс продукта их посев проводят в среду также в соотношении 1 : 3 по объему. Пробы гомогенизируют с использованием гомогенизаторов перистальтического типа или ножевых.

11.5.2. Гомогенизированную пробу в RM L бульоне термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 6 ч.

11.5.3. Переносят 10 см³ инкубированной в RM L бульоне пробы в 90 мл обогатительного бульона RM L, предварительно нагретого до температуры 41 °С. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 16 ч.

11.5.4. Маркируют пробирки, входящие в набор «Lumiprobe 24 *Listeria monocytogenes*» в соответствии с номерами исследуемых проб и

помещают в штатив для 12 мм пробирок с держателем. Не рекомендуются одновременно анализировать более 20 проб.

11.5.5. Внесение проб (после инкубации в течение 16 ч) и всех реагентов (лизирующего и гибридизационного буферов, конъюгата, субстрата) необходимо производить быстро и не касаясь наконечником краев пробирки. Не допускается использование одного наконечника для внесения разных проб или растворов буферов.

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

11.5.6.1. Лизирующий буфер в количестве 100 мкл.

11.5.6.2. Исследуемую пробу в обогательном бульоне RM L в количестве 100 мкл.

В качестве отрицательного контроля (ОК) используют стерильный бульон RM L – 100 мкл. Пробу стерильного бульона RM L, используемого в качестве отрицательного контроля, термостатируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 16 ч.

В качестве положительного контроля (ПК) используют тест-культуру *Listeria monocytogenes*, выращенную на бульоне RM L при 37°C также в количестве 100 мкл.

11.5.6.3. Пробирки закрывают адгезивной уплотнительной защитной пленкой (из набора), быстро перемешивают и помещают для инкубирования в водяную баню при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 15 мин.

11.5.7. Проведение гибридизации: вынимают штатив из водяной бани, удаляют защитную пленку и добавляют в каждую пробирку гибридизационный буфер по 250 мкл, закрывают пробирки новой защитной пленкой и интенсивно встряхивают. Пробирки с внесенным гибридизационным буфером инкубируют в водяной бане при температуре $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 60 мин.

11.5.8. Выявление гибридов:

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

11.5.8.2. Не вынимая пробирки из штатива, быстро заполняют каждую пробирку промывочным буфером по п. 4.3.3 в количестве 5 см^3 , используя диспенсер, после чего быстро опустошают пробирки. Процедуру промывки проводят еще три раза. При проведении второй промывки также быстро полностью опустошают пробирки сразу после заполнения их промывочным буфером. Третий и четвертый раз промывают пробирки следующим образом: после заполнения пробирок промывочным буфером ждут 30 с перед тем, как полностью их опустошить.

Порядок заполнения пробирок промывочным буфером:

Первую и третью промывки начинают с первой пробирки, вторую и четвертую промывки – с последней пробирки.

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

11.5.8.3. Во все пробирки вносят раствор конъюгата по 100 мкл. Покрывают пробирки новой уплотняющей защитной пленкой и сильно встряхивают штатив. Инкубируют в водяной бане при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. Штатив вынимают из водяной бани, удаляют защитную пленку и быстро выливают содержимое всех пробирок одновременно, не вынимая их из штатива.

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

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

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

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

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

Примечания.

- Стадия гибридизации должна начинаться не позднее 45 мин после стадии лизиса.
- Качество гибридизации и фиксации конъюгата зависят от времени и температуры инкубации, которые необходимо строго соблюдать.

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

11.5.10. Учет результатов.

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

Определение пороговой величины измерения:

пороговая величина (отсекающее значение) определяется как уровень хемилюминесценции пробы с отрицательным контролем (ОК), умноженный на коэффициент 3 («Cut-off» фактор).

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

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

11.5.11. Результаты выявления *Listeria monocytogenes* в определенной навеске продукта записывают: «бактерии *Listeria monocytogenes* обнаружены в 25 г (см³) (в 50—100 г (см³) для продуктов детского, лечебного и специализированного питания) продукта» или «бактерии *Listeria monocytogenes* не обнаружены в 25 г (см³) (в 50—100 г (см³) для продуктов детского, лечебного и специализированного питания) продукта».

11.5.12. Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.