

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
И ПРОФИЛАКТИКА БОТУЛИЗМА**

Методические указания
МУ 3.1/4.2. ~~4279~~ -26

Москва 2026

Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика ботулизма. МУ 3.1/4.2. ~~4273~~-26

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е.Б. Ежлова, А.А. Мельникова, А.А. Шулепина); ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (В.Г. Акимкин, В.В. Малеев, А.В. Горелов, А.А. Плоскирева, Н.Ю. Пшеничная, Ж.Б. Понежева, А.А. Гришаева, О.А. Абросимова); ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора (Г.М. Дмитриева); ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (Ю.В. Демина, Ю.А. Захарова, Н.И. Еремеева); ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (Н.В. Зайцева, П.З. Шур, С.В. Клейн, Д.Н. Лир, Д.В. Суворов, Н.В. Никифорова, С.Е. Зеленкин, Е.В. Хрущева, С.В. Редько); ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (И.А. Дятлов, М.В. Храмов, Н.Н. Карцев, О.Е. Хохлова, А.И. Борзилов, Л.В. Домотенко, М.В. Фурсов, А.А. Кисличкина, П.В. Соловьев, И.П. Мицевич).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой «10» апреля 2026 г.

3. Введены впервые.

УТВЕРЖДАЮ

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



А.Ю. Попова А.Ю. Попова

«10» *сентября* 2026 г.

Дата введения «10» *сентября* 2026 г.

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА БОТУЛИЗМА

Методические указания
МУ 3.1/4.2. *4279* -26

I. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУ) описывают подходы к организации и обеспечению эпидемиологического надзора за ботулизмом, включающего проведение санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий и лабораторной диагностики при ботулизме.

1.2. МУ предназначены для специалистов органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор) и учреждений, обеспечивающих их деятельность, а также могут быть использованы специалистами органов исполнительной власти в сфере охраны здоровья, юридическими лицами, индивидуальными предпринимателями и физическими лицами, специалистами в области ветеринарии, медицинских организаций, независимо от ведомственной принадлежности и организационно-правовой формы, осуществляющих диагностические, мониторинговые и научные исследования с материалом, подозрительным на наличие ботулинических токсинов и (или) возбудителем ботулизма, а также со штаммами,

продуцирующими ботулинический нейротоксин *Clostridium botulinum* (далее – *C. botulinum*), *Clostridium baratii* (далее – *C. baratii*), или *Clostridium butyricum* (далее – *C. butyricum*), *Clostridium argentinensis* (далее – *C. argentinensis*).

II. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2.1. Ботулизм – это пищевое отравление (заболевание) инфекционно-токсического генеза, вызванное возбудителем ботулизма, обусловленное действием протеинового нейротоксина, вырабатываемого вегетативными формами *C. botulinum*, *C. baratii* или *C. butyricum*, *C. argentinensis*. Ботулизм может поражать человека и животных.

Ботулизм клинически характеризуется парезами, параличами поперечнополосатой и гладкой мускулатуры, иногда в сочетании с синдромом гастроэнтерита в начальном периоде, угнетением секреции желез, контролируемых холинергической иннервацией, таких как слюнные, слезные и потовые железы. Вялый паралич, приводящий к нарушению дыхания, является причиной смерти в тяжелых случаях. Ботулизм возникает в результате блокады высвобождения нейромедиаторов, в частности ацетилхолина, в нервно-мышечных соединениях и других холинергических нейронах, сильнодействующих нейротоксинов, называемых ботулиническими нейротоксинами, которые протеолитически расщепляют растворимый рецептор белка присоединения, чувствительный к N-этилмалеимиду и белки, участвующие в экзоцитозе нейромедиаторов [1].

Возбудитель ботулизма

2.2. Ботулизм вызывается токсинами, синтезируемые такими видами клостридий, как *C. botulinum*, и реже другими видами клостридий, например, токсигенными штаммами *C. baratii*, *C. butyricum* и *C. argentinensis*. Микроорганизм является сапрофитом, распространен повсеместно в окружающей среде и способен неограниченно долго сохраняться в естественных условиях. Токсин вырабатывается только при прорастании спор, которое происходит при определенных условиях: анаэробная среда, кислотность среды при $pH > 4,5$, низкое содержание соли и сахара и температура плюс 3 – 37 °C в зависимости от серотипа бактерии [2, 3].

2.3. Ботулинические токсины являются наиболее сильнодействующими из известных биологических токсинов. В настоящее время известны 9 токсинотипов (описан 41 подтип [1, 4, 5-7] ботулотоксинов (А, В, С, D, Е, F, G, H, или H/A, или F/A, X). Но вспышки ботулизма среди людей чаще всего обусловлены токсином типа А, реже – типами В, С, Е, F. Токсин D вызывает заболевания только у других млекопитающих и водоплавающих птиц. Большинство штаммов *C. botulinum* продуцируют только один токсин, хотя были идентифицированы штаммы, продуцирующие два типа токсинов. Все типы ботулинического токсина имеют схожую структуру, состоящую из белка цинк-эндопептидазы, образованного тяжелой цепью длиной около 100 000 дальтон и легкой цепью длиной около 50 000 дальтон. Ботулинический токсин в условиях окружающей среды сохраняется до 1 года, в консервированных продуктах более года. Наличие токсина в пищевых продуктах не вызывает изменения их внешнего вида и органолептических свойств.

Эпидемиологические особенности ботулизма

2.4. Естественным источником и резервуаром возбудителя является почва, тепло- и холоднокровные животные, рыба. Не вызывая заболевания, возбудитель обитает в кишечнике лошадей, коров, свиней, кроликов, норок, крыс, кур и других представителей животного мира и выделяется с фекалиями в окружающую среду. Возбудитель размножается в иле слабопроточных водоемов, силосных ямах, трупах павших животных. Возбудитель вырабатывает токсин после смерти животных при снижении их температуры тела до плюс 20 – 25 °С.

2.5. Основной механизм заражения человека – фекально-оральный, возможна реализация контактного и аэрозольного механизмов передачи.

2.6. Фекально-оральный механизм реализуется чаще пищевым путем при употреблении продуктов, содержащих ботулотоксин.

2.7. Возникновение пищевого ботулизма возможно только при употреблении продуктов, в которых в анаэробных условиях произошли размножение возбудителя и накопление токсина. Анаэробные условия создаются в результате герметизации продуктов или потребления кислорода аэробной флорой (например, стафилококком).

2.8. В настоящее время консервы фабричного производства редко являются причиной заболевания. В основном, заражение происходит вследствие употребления грибов, овощей, рыбы и мяса домашнего приготовления (консервирования, соления, вяления), приправ, сохраняемых в растительном масле без подкисления овощей, тушеных в алюминиевой фольге.

2.9. Возможна регистрация единичных случаев пищевого ботулизма у детей до одного года, связанных с использованием в кормлении продуктов, содержащих споры *C. botulinum*. Одним из факторов передачи ботулизма у детей может быть мед. Также к редким случаям относится кишечный ботулизм в дистальных отделах кишечника при болезни Крона.

2.10. Инкубационный период пищевого ботулизма составляет от нескольких часов до 5 суток (в среднем 18 – 24 часа). Перенесенное заболевание иммунитета не оставляет.

2.11. Эпидемиологическими особенностями также является «кустообразное поражение» лиц, употребивших инфицированный продукт: токсин может накапливаться в продукте «гнездно», поэтому клинические симптомы заболевания развиваются не у всех лиц. Уровень токсина в сыворотке крови пациента зависит от количества токсина, попавшего в организм, и времени, прошедшего между попаданием токсина в организм и забором сыворотки.

2.12. Контактный механизм передачи ботулизма может реализовываться при попадании возбудителя в рану, которое чаще всего происходит при контакте с почвой, при этом развивается раневой ботулизм.

2.13. Заражение ботулизмом возможно при вдыхании аэрозоля, содержащего ботулотоксин.

2.14. В связи с использованием ботулотоксина при оказании медицинской помощи и косметологических услуг существуют риски побочных эффектов (передозировка), связанных с его применением.

Устойчивость возбудителя ботулизма к факторам окружающей среды

2.15. Возможность и интенсивность заражения продуктов питания вегетативными формами и спорами *C. botulinum* зависит от санитарных и технологических условий их обработки и хранения.

2.16. Продукты, содержащие возбудитель или токсин, обычно не имеют признаков порчи, не изменены по виду, запаху и вкусу и не имеют измененных органолептических свойств, возможен бомбаж.

2.17. Вегетативные клетки.

Оптимальной для роста и токсинообразования всех образующих токсинов типов (токсинотипов) *C. botulinum* является температура плюс 28 – 35 °С. Большинство консервированных продуктов, хранящихся при комнатной температуре, являются благоприятной средой для их размножения. В продуктах с относительной влажностью 95 %, содержанием поваренной соли (NaCl) – 10 % или сахара – 50 % и рН 4,5 – 8,0 *C. botulinum* может развиваться при температуре плюс 10 – 55 °С. Для представителя токсинотипа Е и некоторых штаммов В и F достаточными для роста является температура плюс 3,3 – 40 °С. Значимым фактором для размножения и токсинообразования *C. botulinum* считается содержание в продукте менее 6 % NaCl. Возбудитель не развивается при рН ниже 3,7.

2.18. Споры.

Споры *C. botulinum* устойчивы к физическим, химическим воздействиям и биоцидам. Представители токсинотипов А, В и некоторые штаммы токсинотипа F хорошо переносят кипячение (при температуре плюс 100 °С) в течение 5 часов, токсинотипа Е – выдерживают температуру не выше плюс 80 °С. При низких температурах споры сохраняются в течение года при минус 16 °С и нескольких минут – при минус 190 °С. Выживаемость спор в 20 % растворе формалина и 6 % растворе перекиси водорода составляет 24 часа, в 10 % растворе соляной кислоты – 1 час. В дезинфицирующих средствах на основе этилового спирта споры сохраняют жизнеспособность 2 месяца. Эффективным способом уничтожения спор является автоклавирование при температуре плюс 132 °С, 2 атм, в течение 90 минут. На прорастание спор оказывает влияние сопутствующая микрофлора (например, развитие плесени в томатном соке снижает его кислотность, что создает благоприятные условия для перехода возбудителя из спор в вегетативные формы, продуцирующие токсин).

2.19. Токсины.

Ботулинический токсин относительно устойчив к воздействию окружающей среды: температуре, свету, рН, высоким концентрациям солей. Он инактивируется при температуре плюс 100 °С в течение 10 – 15 минут. Полностью не разрушается под действием прямого солнечного света и воздуха. В кислой среде (рН 3,5 – 6,8) устойчивость токсина выше, чем в щелочной (рН 7,0 – 8,0). Высокая концентрация поваренной соли препятствует токсинообразованию, но не разрушает уже имеющийся токсин. Сахароза повышает устойчивость к нагреванию токсинов типа А и В. Так, при концентрации сахарозы от 43,5 до 87 % токсин выдерживает нагревание при температуре плюс 100 °С в течение 10 минут, а при плюс

80 °С – до 40 минут. Степень термоустойчивости токсина зависит от вырабатывающего его штамма и питательной основы.

Температура заливки рассола при консервировании, температура и временной интервал стерилизации зависят от объема и материала тары, вида стерилизующего устройства¹.

Токсины типов А и В устойчивы в воде к присутствию аутохтонных микроорганизмов, воздействию света и летних температур. Этот факт указывает на возможность заражения водоемов, служащих для водопоя животных.

Разрушает токсин 6 % раствор перекиси водорода, хлорсодержащие и йодсодержащие соединения, марганцовокислый калий, бром, кристалвиолет. Токсины А, В, С, D и Е при разведении водой становятся чувствительными к действию указанных химических веществ. Токсин не растворяется в эфире и хлороформе.

Сроки сохранения активности ботулинических токсинов в напитках и растворах различна (см. таблицу 1).

Таблица 1

Сроки сохранения активности ботулинических токсинов в растворах, водопроводной воде и напитках при температуре плюс 4 °С

Растворы и напитки	Сроки сохранения активности токсинов в % от исходной, сутки											
	токсин типа А (%)				токсин типа В (%)				токсин типа С (%)			
	100	50	25	10	100	50	25	10	100	50	25	10
Водопроводная вода	1	2-3	4-10	14-21	-	-	-	1	8-12	19-45	-	75-128
Спирт 40 %	-	-	-	-	1-2	8-13	23-70	100	2-6	8-10	-	-
Фруктовая вода	58	76	-	90	7-76	89	105	-	12-80	128	-	75-128
Минеральная вода	1-4	29	-	30-58	1-8	9-13	-	22-71	1-4	29	-	30-58
Сухое вино	1	2-3	4	-	1-2	7-8	13	-	1-2	12	-	15
Десертное вино	3-4	6-14	14-28	30-90	1-2	9	-	77-91	14	-	-	63
Пиво	21-30	30-45	91	-	13-23	76	103	-	14-75	128	92	95-128
Желатин-фосфат. буфер	14-44	45	90	-	20-26	45	90	14	36	77	-	-
0,85 % раствор NaCl	14-25	41	90	-	7	20-77	60-90	-	8	63	77	-

При повышении температуры до плюс 22 – 35 °С разрушение токсинов в перечисленных напитках и растворах происходит быстрее.

Характерной особенностью ботулинических токсинов является устойчивость к воздействию пищеварительных ферментов (трипсина,

¹ Примечание: режимы стерилизации плодоовощной консервированной продукции разрабатывает Всероссийский Научно-исследовательский институт технологии консервирования (ВНИИТеК) – филиал ФГБНУ ФНЦ пищевых систем им. В.М Горбатова РАН. Режимы стерилизации консервированной мясной, плодоовощной продукции разрабатываются ФГБНУ ФНЦ пищевых систем им. В.М Горбатова РАН в соответствии с утвержденными документами.

панкреатина) и микробных протеаз. Под их влиянием в организме человека возбудитель может продуцировать протоксин, который способен активироваться и превращаться в токсин, при этом его активность в 20 – 100 раз превышает активность исходного токсина.

Клинические проявления ботулизма

2.20. Клиника ботулизма человека специфична и складывается из нескольких основных синдромов: паралитического, гастроинтестинального и интоксикационного².

Согласно Международной классификации болезней³ (далее – МКБ-10) ботулизм классифицируется в соответствии с шифром A05.1.

2.21. Выделяют несколько клинических форм болезни⁴:

- пищевой ботулизм (связан с употреблением продуктов питания, содержащих ботулотоксин);
- раневой ботулизм (обусловлен инфицированием ран *C. botulinum* и действием продуцируемого бактерией ботулотоксина);
- ятрогенная форма (развивается в следствии использования лекарственных средств на основе ботулотоксина с нарушением схем дозирования);
- ботулизм детского возраста (отмечается у детей первого года жизни в следствии заражения *C. botulinum* и выделения ботулотоксина в желудочно-кишечном тракте);
- ингаляционный ботулизм (аэрозольная форма) (редко развивается в результате вдыхания аэрозоля ботулинического токсина, связанного со случайными или преднамеренными событиями (такими как биотерроризм), которые приводят к распылению токсинов в виде аэрозоля);
- ботулизм неуточненной природы (установить связь между заболеванием и пищевым продуктом или другими факторами окружающей среды не удается).

2.22. Наиболее часто регистрируемыми симптомами у пациентов с ботулизмом являются дисфагия, ухудшение зрения, диплопия, дизартрия и осиплость голоса, диспепсический синдром, сухость во рту и одышка. Наиболее распространенными клиническими признаками являются нисходящий паралич, птоз и офтальмоплегия.

Первыми симптомами ботулизма являются нарушение зрения и дискомфорт в животе, за которыми следует появление симптомов поражения черепно-мозговых нервов и нисходящий вялый двусторонний паралич. Степень неврологических симптомов может варьировать от простого птоза или легких поражений черепно-мозговых нервов до нисходящего двустороннего вялого паралича, охватывающего дыхательную мускулатуру, конечности и аксиальные

² Клинические рекомендации «Ботулизм у детей – 2024-2025-2026», утвержденные Минздравом России 30.09.2024 (далее – Клинические рекомендации 2024-2025-2026); Клинические рекомендации – «Ботулизм у взрослых – 2025-2026-2027», утвержденные Минздравом России 16.05.2025 (далее – Клинические рекомендации 2025-2026-2027).

³ МКБ-10 – mkb-10.com/index.php?pid=133 (в свободном доступе).

⁴ Клинические рекомендации 2025-2026-2027.

мышцы, иннервируемые черепными нервами. Неврологические проявления ботулизма у младенцев могут включать гипотонию, слабый плач и плохой аппетит. Этот период кратковременен и обычно не превышает 12 – 24 часов⁵.

Клиническая картина ботулизма у большинства пациентов развивается остро, так что больные могут указать даже час начала заболевания. Реже может иметь место продромальный период, когда пациентов беспокоит недомогание, разбитость, слабость, головные боли.

Ранние желудочно-кишечные симптомы (тошнота, рвота, жидкий стул) чаще встречаются у лиц с ботулизмом пищевого происхождения. Запор может быть ранним симптомом среди детей.

Описаны клинические случаи развития дыхательной недостаточности без предшествующего неврологического дефицита и случаи только желудочно-кишечной симптоматики без неврологических проявлений.

III. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БОТУЛИЗМА

3.1. В структуру лабораторной диагностики ботулизма включают биологические (токсикологические), микробиологические, серологические и молекулярно-генетические исследования.

Лабораторная диагностика ботулизма, его индикация, проведение мониторинга осуществляется лабораториями учреждений, проводящих первичные исследования проб биологического, секционного материала, проб из объектов окружающей среды, пищевых продуктов на ботулизм, на территориальном уровне лабораториями федеральных бюджетных учреждений здравоохранения центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации (далее – ФБУЗ «ЦГиЭ»), на региональном уровне в лабораториях центров индикации возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, на федеральном уровне – в лабораториях Референс-центра по мониторингу за клостридиозами на базе ФБУН «Государственный научно-исследовательский центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (далее – Референс-центр) и центров верификации диагностической деятельности, осуществляющих функцию государственных коллекций (далее – центр верификации)⁶.

Организация деятельности, номенклатура и методы исследований на территориальном уровне (в лабораториях ФБУЗ «ЦГиЭ» в субъектах Российской Федерации) включают: индикацию возбудителя ботулизма в биологическом материале, в том числе секционном, пробах из объектов окружающей среды и продуктов питания; упаковку, транспортировку, хранение проб биологического материала и объектов окружающей среды, микроскопию,

⁵ Клинические рекомендации 2024-2025-2026.

⁶ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации», с изменениями, внесенными приказами Роспотребнадзора от 15.04.2024 № 285, от 28.11.2024 № 949, от 14.08.2025 № 579, от 25.02.2026 № 109 (далее – приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116).

бактериологический метод диагностики, постановку биологической пробы, генодиагностические исследования (полимеразная цепная реакция (далее – ПЦР) в реальном времени (далее – ПЦР-РВ), иммуносерологические исследования (например, иммуноферментный анализ (далее – ИФА), иммунохроматография (иммунохроматографический анализ (далее – ИХА), при использовании зарегистрированных в установленном порядке тест-систем⁷.

Организация деятельности, номенклатура и методы исследований Референс-центра включают: например, анализ эпидемиологических рисков, ассоциированных с распространением возбудителя, возникновением атипичных и новых штаммов; углубленное изучение выделенных культур микроорганизма с использованием современных методов анализа и характеристики возбудителя; направление в центры верификации культур микроорганизмов в установленном порядке⁸; микроскопию, бактериологический метод диагностики, постановку биологической пробы, молекулярно-биологические исследования (выделение нуклеиновых кислот, обратная транскрипция, ПЦР, ПЦР-РВ, реакция транскрипционной амплификации, пульс-электрофорез, популяционное секвенирование по Сенгеру, массовое параллельное секвенирование, ДНК-микроэрей и иммунохимические исследования (например, ИФА, метод флуоресцирующих антител (МФА), серологические реакции, иммуноблоттинг, микроэрей), масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов, протеомный анализ, ИХА, биоинформатические исследования.

Организация деятельности, номенклатура и методы исследований центра верификации диагностической деятельности включают: например, верификацию результатов этиологической диагностики выделенного возбудителя ботулизма, проведенных центрами индикации; идентификацию культур возбудителя; проведение молекулярно-эпидемиологических исследований и изучение бактериологических, молекулярно-биологических, серологических, иммунохимических свойств возбудителя; микроскопию, бактериологический метод диагностики, постановку биологической пробы, генодиагностические исследования, (ПЦР, ПЦР-РВ, пульс-электрофорез, полногеномный и капиллярный сиквенс) и иммуносерологические исследования (например, ИФА, серологические реакции, иммуноблоттинг), масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов, иммунохроматография, электронная микроскопия; хранение коллекционных штаммов, охраноспособное и авторское депонирование.

Организация деятельности, номенклатура и методы исследований центров секвенирования включают: получение генетической информации с целью осуществления эпидемиологического надзора на новом уровне с использованием мониторинга и прогнозирования эпидемиологической ситуации с помощью экспресс-генотипирования возбудителя, расшифровка структуры генома

⁷ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».

⁸ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

возбудителя, анализ генетической изменчивости патогена с помощью современных методов высокопроизводительного секвенирования в специализированных структурных подразделениях учреждений Роспотребнадзора с последующим детальным биоинформатическим анализом получаемой геномной информации и размещением информации в национальной базе данных генетической информации VGARus⁹.

Быстрая и точная лабораторная диагностика ботулизма важна для начала раннего специфического этиологического лечения, для профилактики ботулизма у лиц, употреблявших продукты, которые вызвали отравление, а также для изучения эпидемиологии ботулизма.

Наиболее информативным методом для обнаружения и идентификации токсина как в сыворотке больных, так и в подозрительных продуктах является биологическая проба с реакцией нейтрализации на мышах.

Все работы с биологическими веществами, биологическими и микробиологическими организмами, возбудителем ботулизма и ботулотоксином должны выполняться в лаборатории в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹⁰.

Лаборатории, здания и виварии для проведения работ с возбудителем ботулизма, а также уровень подготовки специалистов, проводящих исследования, должны соответствовать санитарно-эпидемиологическим требованиям¹¹.

К работе по уходу за инфицированными животными и уборке помещения блока для работы с инфицированными животными допускают сотрудников в соответствии с должностными обязанностями¹².

Забор биологического и аутопсийного материала¹³

3.2. На исследование от больного направляют кал, рвотные массы или промывные воды желудка, а также мочу, кровь, отделяемое из раны, фрагменты отторгаемых тканей и мазки – отпечатки с поверхности раны (в случае раневого

⁹ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

¹⁰ Пункты 134 – 137 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный № 62500), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 № 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный № 67587); от 25.05.2022 № 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный № 68934); от 25.06.2025 № 12 (зарегистрировано Минюстом России 25.07.2025, регистрационный № 83058) (далее – СанПиН 3.3686-21).

¹¹ Пункты 143 – 157, 162, 164 – 271 СанПиН 3.3686-21.

¹² Пункт 254 СанПиН 3.3686-21.

¹³ Приказ Минздрава России от 18.05.2021 № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований» (зарегистрирован Минюстом России 01.06.2021, регистрационный № 63737), с изменениями, внесенными приказом Минздрава России от 23.11.2021 № 1088н (зарегистрирован Минюстом России 30.11.2021, регистрационный № 66103) (далее – приказ Минздрава России от 18.05.2021 № 464н).

ботулизма)¹⁴. Забор материала для лабораторных исследований осуществляют при первом подозрении на ботулизм до введения больному противоботулинической сыворотки. Пробы отбирают в максимально короткие сроки после заболевания в стерильную посуду, не обработанную дезинфицирующими средствами. Консерванты не добавляют. До поступления в лабораторию исследуемый материал хранят в холодильнике при температуре плюс 2 – 8 °С, так как ботулинический токсин частично разрушается при комнатной температуре.

Материал для исследования отбирают с соблюдением условий стерильности в стеклянную или одноразовую посуду и закрывают плотно пригнанными стеклянными, резиновыми, корковыми или закручивающимися крышками; забор материала осуществляется с применением медицинских изделий, предназначенных для этих целей в соответствии с алгоритмом, утвержденным в медицинской организации (например, стандартной операционной процедурой (СОП)).

Аутопсийный материал для исследования из различных мест (органов), кал берут в количестве не менее 10 – 50 г, рвотные массы или промывные воды желудка не менее 10 – 50 мл. К взятым пробам не добавляют консервирующие вещества.

3.3. Кровь от больного берут до введения ему лечебной сыворотки в количестве не менее 10 мл (оптимальный объем 20 мл) из вены с использованием стерильных медицинских изделий, предназначенных для забора крови¹⁵.

Для лучшего формирования сгустка кровь обводят по стенкам пробирки капилляром пастеровской пипетки, после чего выдерживают в термостате 20 минут при температуре плюс 37 °С.

3.4. Промывные воды желудка берут в объеме 50 – 100 мл, а кал – в количестве 50 – 60 г в стерильные емкости; консервирующие вещества не добавляют.

3.5. Для аутопсийного исследования берут фрагменты печени весом 50 – 60 г, фрагменты тонкого кишечника и желудка с содержимым, кровь (не менее 10 мл). Пробы из органов берут в стерильных условиях: поверхность органа прижигается раскаленным шпателем и затем стерильными ножницами из глубины вырезается кусочек органа. Пробы из каждого органа берут в отдельные стерильные емкости, закрытые пробками или крышками.

Забор аутопсийного материала проводит специалист (врач-судебно-медицинский эксперт, врач-патологоанатом).

Отбор проб биологического материала от больного проводится медицинским работником (со средним специальным или высшим специальным образованием) или самим пациентом или иным лицом, осуществляющим уход за пациентом, если это касается естественных выделений¹⁶.

¹⁴ Клинические рекомендации 2025-2026-2027.

¹⁵ ГОСТ Р 59778-2021 «Процедуры взятия проб венозной и капиллярной крови для лабораторных исследований», введенный приказом Росстандарта от 21.10.2021 № 1212-ст.

¹⁶ Приказ Минздрава России от 18.05.2021 № 464н.

Отбор проб пищевых продуктов

3.6. Во всех случаях пищевых отравлений с симптомами, напоминающими ботулизм, даже при легких формах клинического течения, а также при всех случаях тяжелых пищевых отравлений при подозрении на ботулизм, наряду с исследованиями на сальмонеллы, стафилококки и группу *Clostridium perfringens* (далее – *C. perfringens*), проверяют продукты и остатки продуктов после употребления на содержание возбудителя и токсина ботулизма. Осуществляют исследование продуктов питания, возможно причастных или непосредственно вызвавших отравление ботулотоксинами (но только те емкости или остатки продукта, которые употребляли потерпевшие).

Отбор проб пищевых продуктов осуществляют в необходимом количестве, указанном для каждого пищевого продукта¹⁷, в случаях отсутствия необходимого количества пищевого продукта, пробы отбирают в количестве не менее 100 г. По возможности берут несколько проб из различных мест транспортной упаковки (потребительской фасовки или кусковой части пищевого продукта). К взятым пробам не добавляют консервирующие вещества. Материал для исследования отбирают с соблюдением условий стерильности в стеклянную или одноразовую посуду и закрывают плотно пригнанными стеклянными, резиновыми, корковыми или завинчивающимися крышками. При отсутствии стерильной посуды образцы отбирают в чистые емкости с крышкой без следов каких-либо веществ и дезинфицирующих средств после предварительного 15-минутного их кипячения.

Отбор образцов (проб) осуществляется в присутствии представителя хозяйствующего субъекта, имеющего отношение к отбираемой пищевой продукции, лицами, требования к квалификации которых установлены законодательством¹⁸, в качестве которых могут выступать: а) при проведении обязательной оценки соответствия пищевой продукции требованиям технических регламентов – заявитель либо уполномоченное заявителем лицо, в качестве которого могут выступать включенные в единый реестр органов по оценке соответствия продукции – орган по сертификации, область аккредитации которого распространяется на пищевую продукцию, или аккредитованная испытательная лаборатория (центр), область аккредитации которой предусматривает отбор образцов (проб) либо иная испытательная лаборатория; б) представители органов,

¹⁷ ГОСТ 31904-2012 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний», введенный приказом Росстандарта от 05.06.2013 № 148-ст (далее – ГОСТ 31904-2012); ГОСТ 7702.2.0-2016 «Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям», введенный приказом Росстандарта от 08.09.2016 № 1091-ст; ГОСТ 10444.7-86 «Продукты пищевые. Методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*», введенный постановлением Госстандарта СССР от 12.05.1986 № 1214 (далее – ГОСТ 10444.7-86); рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 31.07.2018 № 13 «Об отборе образцов (проб) для проведения исследований (испытаний) и измерений пищевой продукции при применении и исполнении требований технических регламентов Евразийского экономического союза» (далее – Рекомендация от 31.07.2018 № 13).

¹⁸ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» от 28.06.2019 (далее – ГОСТ ISO/IEC 17025-2019).

осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор)¹⁹.

Отбор проб и подготовка к анализу мяса и мясных продуктов

3.7. Пробы отрезают стерильным ножом или другими стерильными инструментами. Из отобранных единиц продукции отбирают объединенную пробу:

- от крупнокусковых и мелкокусковых мясокостных полуфабрикатов, порционных бескостных полуфабрикатов отбирают пробу, в которой бескостная часть составляет не менее 500 г;

- от мясного блока, в зависимости от способа обработки мяса, отбирают целый кусок бескостного мяса массой не менее 500 г или мясо, в котором бескостная часть составляет не менее 500 г;

- от тримминга, мяса механической обвалки (дообвалки), пищевых субпродуктов, в том числе замороженных, кишок-сырца, кишок-полуфабрикатов, кишок-фабрикатов, от мелкокусковых и порционных бескостных, порционных мясокостных, рубленых мясных (мясосодержащих), формованных кусковых (рубленых), фаршированных полуфабрикатов, мясного (мясосодержащего) фарша и от полуфабрикатов, панированных в тесте, мясного (мясосодержащего) кулинарного изделия отбирают продукт общей массой не менее 500 г;

- от колбасных изделий отбирают не менее двух точечных проб на расстоянии 15 см от края батона и из них составляют объединенную пробу. Если длина колбасного изделия не более 15 см, то отбирают два батона целиком;

- сосиски и сардельки (точечные пробы) отбирают из разных мест транспортной упаковки партии, не нарушая целостности единиц продукции, при этом из нескольких точечных проб составляют объединенную пробу;

- от партии языков из двух единиц продукции с выполнением мер стерильности по всей толщине продукта вырезают пробы длиной не менее 8 см каждая и из них составляют объединенную пробу;

- от готовых продуктов из говядины, свинины, баранины и мяса других видов животных отрезают точечные пробы по всей толщине продукта длиной не менее 10 см от двух единиц продукции и из двух точечных проб составляют объединенную пробу;

- от готового окорока, изготовленного из тазобедренной части туши, срез делают шириной не менее 10 см и отбирают по всей толщине продукта в месте сочленения берцовой и бедренной костей;

- от окорока, изготовленного из лопаточной части туши, срез шириной 10 см делают и отбирают по всей толщине продукта в месте сочленения лопатки и плечевой кости;

- от изделий без оболочки (например, студни, паштеты) точечные пробы отбирают не менее чем от трех единиц изделий массой 200 – 250 г каждая.

3.8. Подготовка проб и отбор их навесок для микробиологического анализа включает в себя размораживание (при необходимости), стерильное вскрытие

¹⁹ Рекомендация от 31.07.2018 № 13.

упаковки (при исследовании упакованных мясных продуктов), обжиг поверхности пробы или отбор навески без стерилизации ее поверхности и измельчение проб. Без стерилизации (обжига) поверхности продукта осуществляют отбор проб от следующих продуктов: тримминга, мяса механической обвалки (дообвалки), пищевых субпродуктов (кроме печени, почек, сердца), кишок-сырца, кишок-полуфабрикатов и кишок-фабрикатов, мелкокусковых бескостных (мясокостных) полуфабрикатов, порционных бескостных (мясокостных) полуфабрикатов, рубленых мясных (мясосодержащих) полуфабрикатов, мясного (мясосодержащего) фарша, формованных кусковых (рубленых) полуфабрикатов, фаршированных полуфабрикатов, полуфабрикатов в тесте, панированных полуфабрикатов, мясных (мясосодержащих) кулинарных изделий, колбасных изделий и продуктов из мяса в нарезке (высота до 5 см), упакованных под вакуумом или в модифицированную газовую среду. Масса навески зависит от установленных в лаборатории значений на исследуемый микробиологический показатель. В зависимости от вида исследуемой продукции объединенную пробу массой 70 – 80 г составляют из точечных проб следующим образом: колбасные изделия в оболочке и продукты из свинины, баранины и говядины помещают в металлический или эмалированный лоток, тщательно протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и дважды обжигают пламенем (спиртом этиловым или другими средствами, разрешенными для этих целей). Затем батоны колбасных изделий разрезают продольно стерильным (фламбированным) ножом или скальпелем на две половинки, не рассекая оболочку противоположной стороны батона. Из свиных, бараньих, говяжьих продуктов на костях и бекона пробы вырезают стерильным инструментом из различных участков обожженного образца на глубине 2 – 3 см от поверхности, предпочтительно ближе к кости. Изделия без оболочки (например, мясной хлеб, паштеты, студни) исследуют с поверхности и из глубины продукта. Для анализа глубинных участков этого вида продукта образцы помещают в металлический или эмалированный лоток, смачивают спиртом и обжигают. Затем делают продольный разрез и отбирают навеску методом, указанным для колбасных изделий и продуктов в оболочке, составляя из них одну объединенную пробу, которую помещают в предварительно взвешенную стерильную бюксу или чашку Петри.

Отбор проб и подготовка к анализу копченой рыбы и продуктов копчения

3.9. Пробы готовой продукции (например, рыба целиком неразделанная, разделанная, куски, тушка, балычок в транспортной упаковке) отбирают в тару из трех единиц транспортных упаковок (ящиков) общей массой не более 500 г. Если продукция находится в потребительской таре весом менее 500 г (полиэтиленовых мешках, коробочках, металлических или полимерных банках), то для анализа отбирается 1 – 2 – 3 ед упаковки без нарушения ее целостности так, чтобы масса пробы не превышала 300 г. Перед анализом банку необходимо вымыть, просушить, металлическую – обжечь спиртом, полимерную – обтереть спиртом, полностью вскрыть, все содержимое измельчить. Из крупной рыбы (1 – 3 шт), рулетов, теши, боковника и других объектов вырезают поперечные куски массой

не более 300 г. Для анализа продукцию горячего копчения измельчают вместе с кожей, а холодного – без кожи, в том и другом случаях не затрагивая кишечник. Перед снятием кожи с рыбы необходимо поверхность объекта протереть спиртом. Берут навеску 10 г и вносят в 90 мл жидкости для разведений.

Отбор проб и подготовка к анализу пресервов

3.10. Для анализа берут 2 банки. Каждая банка анализируется в отдельности. При анализе пресервов пряного или специального посола пробу отбирают из тузлука. Предварительно пресервы тщательно встряхивают. Из пресервов в масле, соусах, где, как правило, небольшое количество жидкой фазы, содержимое банки смешивают с равным количеством 0,1 % раствора пептонной воды, которую учитывают при анализе, перемешивают, затем готовят десятикратные разведения. Из пастообразных пресервов отбирают навески по 10 г, которые вносят в 90 мл жидкости для приготовления разведений.

Отбор проб и подготовка к анализу вяленой рыбы

3.11. Мелкую рыбу отбирают (3 – 10 шт) из разных мест транспортной упаковки обследуемой партии. Пробу составляют из целых экземпляров рыб, предварительно сняв с них кожу в стерильных условиях. От 3 – 4 шт крупной рыбы после снятия кожи вырезают 6 – 8 поперечных кусочков толщиной 1,0 – 1,5 см от приголовной, средней и хвостовой частей (не затрагивая кишечник). Пробу измельчают, гомогенизируют, отвешивают навеску 10 г и помещают в 90 мл жидкости для приготовления разведений.

Отбор проб и подготовка к анализу икорной продукции

3.12. Отбор проб икры, расфасованной в бочки, проводят щупом из верхнего, среднего и нижнего слоев. Для анализа отбирают до 3 % ед. расфасовки, но не менее трех бочек. Общая масса среднего образца должна быть около 100 г. Для выборки икры, расфасованной в емкости вместимостью от 500 мл и более, отбирают по ассортименту (осетр, белуга, севрюга) по 3 банки разных переделов и составляют среднюю пробу массой 50 г. Отбор зернистой и паюсной икры, идущей на экспорт, производят из трех банок одного передела выборочно по виду обработки, расфасовки, консерванту от каждых пяти дат выработки общей массой 50 г. При расфасовке икры в металлическую, стеклянную или другую тару вместимостью до 300 мл отбирают по 1 ед. расфасовки. Пастеризованную икру берут на анализ по каждому виду тары и по ассортименту в количестве около 100 г (3 банки по 28,6 г, 2 банки по 57,0 г и 1 банка по 85,0 г). При этом, как из трех банок, так и из двух составляются средние пробы. Ястычную икру (соленую, вяленую, копченую) в потребительской таре, полиэтиленовых мешках или картонных коробках отбирают, вырезая несколько кусочков из разных мест общей массой 100 г. Белковую икру отбирают в количестве 1 банки по каждому виду тары и по ассортименту. Отобранную среднюю пробу тщательно перемешивают (икра – зерно целое), растирают (паюсная, белковая икра),

измельчают (ястычная икра) и отбирают в стерильную емкость навески икры массой 10 г. К навеске добавляют 0,1 % раствор пептонной воды до 100 мл. Это будет исходное разведение (10^{-1}) для определения общей бактериальной обсемененности. Подготовленный неразведенный продукт можно высевать непосредственно в питательные среды. Жестяные или стеклянные банки с икрой, герметически укупоренные под вакуумом, перед анализом тщательно моют в теплой воде, высушивают и определяют герметичность (аппаратом Бомбаго). При исследовании туб с завинчивающимися пластмассовыми бушонами, банок из полимерных материалов герметичность определяют визуально.

Отбор проб от кусковой продукции²⁰

3.13. Пробы от кусковой продукции массой нетто не более 1000 г отбирают путем взятия точечных проб из разных мест тары и куска продукта с различной глубины, а также с поверхностных слоев, соприкасающихся с тарой, в одну посуду или каждую пробу, отобранную из разных мест, в отдельную посуду в зависимости от цели испытания. Пробы отбирают ложкой, половником, пинцетом или другим инструментом, в зависимости от вида и размера кусков продукта.

3.14. Пробы от кусковой продукции массой не менее 1000 г отбирают одним из следующих методов:

- отрезают или вырезают часть продукта ножом, пилой или другим инструментом. У изделий квадратной формы разрез делают перпендикулярно к грани, у изделий продольной формы – перпендикулярно продольной оси, у шарообразных изделий – клинообразно и отбирают в стерильную посуду, горло которой предварительно обжигают в пламени горелки, или в стерильную пластиковую посуду или в стерильные полиэтиленовые пакеты, или в стерильную фольгу. Пробы отбирают с помощью стерильных инструментов;

- продукт, для которого масса (объем) лабораторной пробы не установлена в настоящих МУ, отбирают не менее 1 единицы продукции в потребительской таре или в нескольких местах режут ножом, отбирают скальпелем с поверхности разреза и из глубины продукта, или не более 1000 г (1 л) от продукции кусковой, жидкой, пастообразной, сыпучей и смешанной консистенции;

- срезают поверхностный слой продукта толщиной от 0,5 до 1 см ножом или проволокой, отбирают продукт, находящийся под срезанным слоем, при помощи скальпеля или прободоотборника (буравчика или зонда). При отборе пробы из глубины продукта специальным стерильным прободоотборником (например, буравчик, зонд, прободоотборник пищевой для замороженного мяса или другое оборудование с аналогичными или лучшими характеристиками), асептически, просверливают продукт в разных местах не менее чем до половины высоты куска. Часть продукта, попавшая в прободоотборник, является точечной пробой;

- от твердого или хрупкого продукта пробы отбирают при помощи долота или другого инструмента.

²⁰ ГОСТ 31904-2012.

Отбор точечных проб повторяют до тех пор, пока не отберут массу (объем) продукта, необходимую для формирования лабораторной пробы, при этом массу (объем) точечных проб допускается не устанавливать.

Отбор проб от жидкой или пастообразной продукции²¹

3.15. Из емкости вместимостью не более 1 л пробу отбирают пипеткой или металлическим половником. Если продукт неоднороден по высоте емкости, то содержимое ее перед отбором пробы тщательно перемешивают. Из емкости вместимостью не менее 1 л пробу отбирают с различной глубины не менее чем из трех слоев продукта, в одну посуду или каждую пробу в отдельную посуду, в зависимости от цели испытания. При отборе проб из резервуара, оснащенного краном, кран сначала промывают, вытирают ватой, пропитанной этиловым спиртом, и обжигают в пламени. Предварительно выпускают от 0,1 до 1 л жидкости (в зависимости от вместимости резервуара и размера диаметра крана) и только после этого отбирают пробы в посуду таким образом, чтобы жидкий (пастообразный) продукт попадал непосредственно в посуду. Данный метод не применим для отбора проб от продуктов, содержащих спирты.

Отбор проб от сыпучих продуктов²²

3.16. Пробу от сыпучего продукта отбирают после его тщательного перемешивания мешалкой или половником. Пробу от продукта, который не может быть перемешан, например, в транспортной или потребительской таре, масса (объем) которой больше массы (объема) лабораторной пробы, от неупакованной продукции или в специализированных транспортных средствах отбирают путем взятия точечных проб из разных мест тары и с различной глубины, а также с поверхностных слоев, соприкасающихся с тарой, в одну посуду или каждую пробу, отобранную из разных мест, в отдельную посуду в зависимости от цели испытания.

Отбор проб от продукции смешанной консистенции

3.17. Пробы отбирают таким образом, чтобы в них входили все компоненты в соотношении, в котором они находятся в продукте. Допускается в зависимости от особенностей анализируемого продукта, цели испытания и предполагаемой микробиологической загрязненности отбирать пробы от каждого компонента отдельно.

²¹ ГОСТ 31904-2012.

²² ГОСТ 31904-2012.

Отбор проб объектов внешней среды²³

3.18. Для бактериологического анализа почвы с одной пробной площадки составляют 10 объединенных проб. Каждую объединенную пробу составляют из трехточечных проб массой от 200 до 250 г каждая, отобранных послойно с глубины 0 – 5 см и 5 – 20 см.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения следует отбирать с соблюдением условий асептики: отбирать стерильным инструментом, перемешивать на стерильной поверхности, помещать в стерильную тару.

Отбор проб (образцов) воды, почвы, воздуха, сточных и (или) дренажных вод, выбросов, сбросов загрязняющих веществ, отходов производства и потребления, продукции (товаров), иных предметов и материалов осуществляет специалист, имеющий соответствующую квалификацию²⁴. Отбор проб (образцов) осуществляется в присутствии контролируемого лица или его представителя и (или) с применением видеозаписи. Отбор проб (образцов) осуществляется в количестве, необходимом и достаточном для проведения инструментального обследования, испытания, экспертизы²⁵.

Транспортировка проб в лабораторию

3.19. На емкости с отобранными пробами биологического и аутопсийного материала наклеивают этикетки, на которых указывают вид материала, порядковый номер пробы, от кого взят с указанием персональных данных, дату и время взятия материала.

3.20. Каждую отобранную лабораторную пробу маркируют этикетками с указанием наименования продукта, предприятия-изготовителя, даты изготовления, срока годности, установленного производителем, номера партии, даты отбора проб (с указанием времени отбора проб), цели микробиологического испытания.

Отобранные пробы, предназначенные для испытания вне предприятия-изготовителя, пломбируют и опечатывают печатью организации, в чьей собственности находится продукция, и транспортируют в лабораторию²⁶.

²³ ГОСТ 17.4.4.02-2017 «Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа», введенный приказом Росстандарта от 17.04.2018 № 202-ст.

²⁴ Приказ Минздрава России от 02.05.2023 № 206н «Об утверждении Квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием» (зарегистрирован Минюстом России 01.06.2023, регистрационный № 73677), с изменениями, внесенными приказами Минздрава России от 19.02.2024 № 72н (зарегистрирован Минюстом России 25.03.2024, регистрационный № 77616); от 29.08.2025 № 515н (зарегистрирован Минюстом России 29.08.2025, регистрационный № 83410); ГОСТ ISO/IEC 17025-2019.

²⁵ Статья 81 Федерального закона от 31.07.2020 № 248-ФЗ «О государственном контроле (надзоре) и муниципальном контроле в Российской Федерации» (далее – Федеральный закон от 31.07.2020 № 248-ФЗ).

²⁶ ГОСТ 31904-2012.

3.21. В сопроводительном документе для биологического и аутопсийного материала указывают²⁷:

- наименование медицинской организации, направляющей пациента на лабораторное исследование, адрес ее местонахождения;
- фамилию, имя, отчество (при наличии) пациента, пол, дату его рождения, при необходимости – дополнительные данные: номер медицинского страхового полиса, иные данные (при наличии);
- номер медицинской карты пациента (при наличии), получающего медицинскую помощь в амбулаторных условиях, или номер медицинской карты стационарного больного в случае, если исследования проводятся при оказании медицинской помощи в стационарных условиях или в условиях дневного стационара;
- диагноз основного заболевания, код диагноза в соответствии с МКБ-10;
- данные о принимаемых больным лекарственных препаратах, а также о других биологических факторах, которые могут влиять на результат исследований;
- наименование лабораторных исследований;
- вид биоматериала;
- тип пробы или указание локализации, откуда был взят биоматериал, и способ взятия (при необходимости);
- эпидемиологический анамнез (при наличии и возможности его сбора у больного или его окружающих);
- дату и время назначения лабораторного исследования;
- дату и время взятия биоматериала;
- фамилию, имя, отчество (при наличии) и должность медицинского работника (врача, фельдшера, акушерки), назначившего лабораторное исследование.

Биоматериал от пациента забирают до введения противоботулинической сыворотки.

3.22. В момент отбора пробы пищевой продукции составляют акт, в котором указывают:

- наименование и адрес организации, отбирающей пробу;
- фамилию лиц, отбирающих пробу;
- место, дату и метод отбора проб;
- наименование продукции, от которой отобраны пробы, и дополнительные данные, характеризующие эту продукцию (например, соблюдение сроков годности и условий хранения, заявленных производителем и другие);
- количество взятых проб;
- количество и описание продукции, от которой отобраны пробы;
- подписи и (или) печати, удостоверяющие лиц и организации, осуществляющей отбор пробы.

3.23. На пробы почвы составляют сопроводительные документы (например, акт отбора), в котором указывают дату отбора пробы, адрес, номер участка, номер пробной площадки, номер объединенной пробы, слой и глубину взятия пробы,

²⁷ Приказ Минздрава России от 18.05.2021 № 464н.

характер метеорологических условий в день отбора, особенности, обнаруженные во время отбора пробы (например, освещение солнцем, применение средств химизации, виды обработки почвы сельскохозяйственными машинами, наличие свалок, очистных сооружений).

3.24. Емкости для транспортировки проб (образцов) тщательно упаковывают.

3.25. Пробы замороженных продуктов укладывают в изотермические емкости (термос, изотермическая коробка) или обкладывают сухим льдом (CO_2), или упаковывают другим способом, обеспечивающим сохранение проб в замороженном состоянии при температуре, не превышающей минус 15°C .

3.26. Пробы консервов и продуктов транспортируют в соответствии с условиями транспортирования продукции, установленными в ГОСТах на конкретный вид продукции.

3.28. Пробы скоропортящихся продуктов транспортируют при температуре плюс 5°C не более 6 часов, за исключением продуктов, на которые предусмотрены специальные условия, предусмотренные в документах по стандартизации на конкретный вид продукта.

3.29. Пересылка проб производится в кратчайший срок, и материал до исследования хранят при температуре плюс $2 - 8^\circ\text{C}$. Упаковку и транспортировку проб, подозрительных на зараженность возбудителем ботулизма и (или) других ПБА, осуществляют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями²⁸.

Подготовка проб для исследований

3.30. Подготовка и исследование образцов пищевых продуктов и клинического материала проводят в разных помещениях или проведение работ разделяют по времени. Поступившие на исследование образцы распределяют в зависимости от физического состояния по категориям:

1) твердые образцы (например, аутопсийный материал, салаты, остатки салатов, фасоль);

2) полутвердые образцы (фекалии, промывные воды, рвотные массы);

3) жидкие образцы (кровь, промывные воды). Твердые и полутвердые образцы в количестве от 2 до 25 г (в зависимости от объемов, поступивших на анализ) измельчают до однородного состояния в стерильных емкостях (например, пакете для гомогенизации или ступке). Измельченный образец переносят в колбу с раствором 0,9 % хлорида натрия (NaCl) в равных объемных соотношениях. Жидкие образцы в количестве 20 – 25 мл переносят в колбу, добавляют равный объем 0,9 % раствора NaCl и осторожно перемешивают. Все подготовленные исследуемые образцы выдерживают при комнатной температуре в течение 30 – 90 минут для экстрагирования токсина.

3.31. Измельченные образцы делят на четыре равные навески. Первую навеску используют для реакции нейтрализации ботулотоксина и биопробы, остальные три – для бактериологического исследования. Одну из трех навесок

²⁸ Пункты 513 – 530 СанПиН 3.3686-21.

используют без обработки, вторую – обрабатывают 96 % этиловым спиртом в равных объемных соотношениях, выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа и периодически встряхивают, третью навеску прогревают при температуре плюс 80 °С в течение 15 минут. Обработку этиловым спиртом и термическую обработку образцов проводят с целью создания селективных условий для подавления сопутствующей вегетативной флоры и выделения спор возбудителя ботулизма из исследуемых образцов.

Например, промывные воды желудка при наличии в них комочков пищи растирают в стерильной ступке или гомогенизаторе. Две трети этой растертой пробы предназначаются для обнаружения ботулинических токсинов, одна треть – для выделения ботулинических микробов. Первую часть растертой пробы выдерживают при комнатной температуре 1 – 1,5 часа для экстрагирования. Затем экстракт фильтруют через ватно-марлевый фильтр или центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 – 20 минут. Полученный фильтрат или центрифугат (надосадочная жидкость) используют для постановки биопробы и последующей реакции нейтрализации в случае гибели подопытных животных.

Цитратную кровь или сыворотку крови больного без предварительного разведения исследуют на наличие ботулинических токсинов с помощью реакции нейтрализации, причем цитратную кровь вводят мышам только внутрибрюшинно.

Для обнаружения токсинов в испражнениях больного кал берут в количестве не менее 10 – 15 г, растирают в стерильной ступке с двойным объемом физиологического раствора и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 – 1,5 часов для экстрагирования токсинов. Затем жидкость фильтруют через ватно-марлевый фильтр или центрифугируют и используют для постановки реакции нейтрализации. Экстракты из аутопсийного материала приготавливают аналогично.

Из объединенной пробы каждого образца мясных продуктов берут в стерильную посуду (пакет для гомогенизации) 20 г продукта с погрешностью, не превышающей 0,1 г. Навеску помещают в стерильную емкость (колбу, стакан, пакет) гомогенизатора для приготовления испытуемой взвеси. Для этого к навеске добавляют в четырехкратном количестве 0,1 % пептонную воду или стерильный физиологический раствор и гомогенизируют. Для посевов на питательные среды стерильной градуированной пипеткой отбирают надосадочную жидкость в объеме не менее 1,0 мл (см³) после 15 минутной выдержки при комнатной температуре, учитывая, что в 1 мл исходной суспензии содержится 0,2 г продукта.

3.32. Для выделения *C. botulinum* типа Е, споры которых погибают при температуре плюс 80 °С, делают дополнительную пятую навеску образца и прогревают ее при температуре плюс 60 °С в течение 15 минут.

Биопроба

3.33. Материал от пациентов с подозрением на ботулизм и материал из объектов окружающей среды подозрительный на наличие ботулотоксина исследуют с помощью биопробы на белых мышах. Обнаружение ботулинического токсина (тип токсина) служит подтверждением диагноза и делает возможным установку диагноза в ранние сроки. Биопроба на мышах

считается «золотым стандартом» для обнаружения и идентификации ботулотоксина. Для обнаружения токсина исследуют образцы сыворотки крови больного, содержимое желудочно-кишечного тракта, образцы паренхиматозных органов, материал из раны, пробы пищи, фекалий или образцы из окружающей среды. Общая схема лабораторной диагностики ботулизма, направленной на выявление токсина и возбудителя представлена на рисунке 1.

3.34. Навеску гомогенизированных проб для постановки реакции нейтрализации, приготовленной по п. 3.31, после экстрагирования фильтруют через ватно-марлевый фильтр или центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 – 20 минут (приложение 1 к настоящим МУ). В случае анализа продуктов фильтрат делят на три части: одну из них оставляют нативной, вторую обрабатывают трипсином или панкреатином (для перевода протаксина Е в токсин), третью прогревают в кипящей водяной бане в течение 30 минут. Каждым фильтратом заражают внутрибрюшинно двух белых мышей массой 16 – 20 г в количестве

0,5 мл. При наличии ботулинического токсина животные, зараженные не кипяченым фильтратом, погибают на 1 – 5 сутки с характерной клиникой ботулизма (шаткая походка, учащенное дыхание, расслабление скелетной мускулатуры, западание брюшной стенки – «осиная талия»). В случае большого содержания ботулотоксина в исследуемых образцах гибель биопробных животных может наступить через 2 часа после введения материала. Животные, которым вводили кипяченный фильтрат, остаются здоровыми.

При обнаружении в исследуемом материале токсина ставят реакцию его нейтрализации с типовыми ботулиническими сыворотками.

При отсутствии необходимости определения типовой принадлежности токсина полученные результаты являются основанием для установки диагноза – ботулизм.

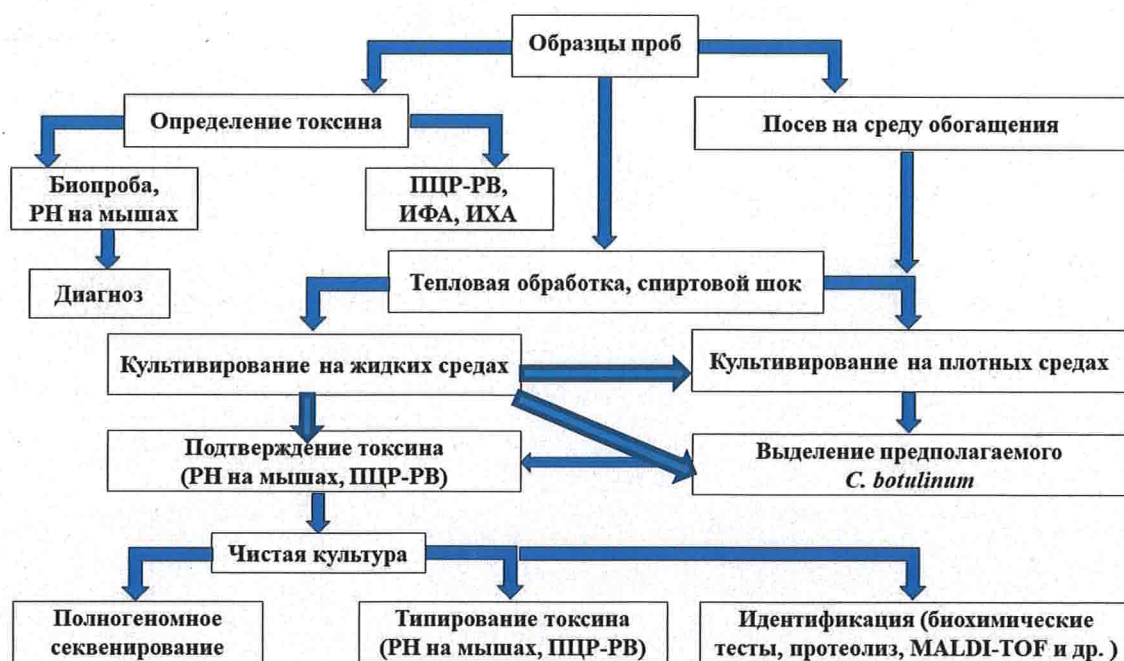


Рисунок 1. Схема лабораторной диагностики ботулизма, направленной на выявление токсина и возбудителя

Выявление ботулинических токсинов в реакции нейтрализации²⁹

3.35. Выявление ботулинических токсинов проводят в соответствии со схемой, представленной на рисунках 2 – 3, в таблицах 3 – 4 или одновременно с использованием противоботулинических антитоксических сывороток в соответствии с таблицей 5. Исследования проводят с подготовленной пробой (далее – ПП), если в ней ботулинический токсин не обнаружен, то ПП обрабатывают протеолитическим ферментом (далее – ППТ).

Для обнаружения токсина в реакции нейтрализации берут 4 мышей весом 16 – 20 г. В связи с тем, что в исследуемом материале могут находиться два и больше типов ботулинических токсинов, то предварительную реакцию ставят со смесью противоботулинических диагностических сывороток типов А, В, С, Е, F.

3.36. Двум мышам вводят исследуемый фильтрат или центрифугат в количестве не менее 0,5 мл внутрибрюшинно или внутривенно в хвостовую вену (внутривенно вводится только центрифугат). Другой паре вводят смесь, состоящую из 0,5 – 0,8 мл (испытуемого материала и 0,2 мл смеси диагностических моновалентных противоботулинических сывороток типов А, В, С, Е, F (по 0,04 мл сыворотки каждого типа). С этой целью выпускают сухие типоспецифические диагностические сыворотки, титр которых должен быть в пределах, указанных в таблице 2.

Таблица 2

Титр специфических диагностических сывороток

Тип сыворотки	Титр сыворотки
А	200 – 400 МЕ
В	100 – 200 МЕ
С	Не менее 150 МЕ
Е	200 – 400 МЕ
F	50 – 100 МЕ

3.37. Доза сыворотки, которая рекомендуется для реакции нейтрализации, как правило, обеспечивает нейтрализацию гомологического токсина в исследуемой пробе.

3.38. Не используют для целей диагностики лечебные противоботулинические сыворотки.

3.39. Перед введением смесь испытуемого материала и сывороток выдерживают при комнатной температуре в течение 30 минут. Количество исследуемого материала, вводимого животным с сывороткой и без сыворотки, используют одинаковое. Наблюдение за животными ведут в течении 4 дней, однако, если мыши болеют или погибают раньше этого срока, то тут же ставят реакцию нейтрализации с моновалентными сыворотками.

3.40. При наличии ботулинического токсина погибают две мыши, которым вводился не смешанный с сыворотками фильтрат, остальные остаются живы.

²⁹ ГОСТ 10444.7-86; Клинические рекомендации 2025-2026-2027.

3.41. В случае обнаружения в пробе ботулинического токсина ставят развернутую реакцию нейтрализации для определения типа токсина с типоспецифическими диагностическими сыворотками. В 6 пробирок разливают по 0,8 мл исследуемого фильтрата, затем в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл сыворотки: в первую пробирку сыворотку типа А, во вторую – типа В, в третью – типа С, в четвертую – типа Е, в пятую – типа F и в шестую добавляют 0,2 мл физиологического раствора. Смесь после 30 минут выдерживания при комнатной температуре вводят внутривенно или внутривентально по 0,5 мл двум мышам из каждой пробирки (таблица 3).

3.42. Для каждой сыворотки берут отдельный шприц. Учет результатов проводят через 4 – 6 часов, 24 часа и далее на протяжении 4 суток. При наличии ботулинического токсина выживают мыши, получившие смесь токсина и гомологической сыворотки, при гибели всех остальных мышей. Тип сыворотки, нейтрализующей токсин, указывает на типовую принадлежность токсина. Например, если гибнут все мыши, кроме тех, которым введено содержимое пробирки № 1, то в исследуемом материале будет установлен токсин типа А.

Таблица 3

Рекомендуемый протокол постановки развернутой реакции нейтрализации

№ пробирки	Исследуемый материал	Антиботулинические сыворотки					Физиологический раствор
		тип А	тип В	тип С	тип Е	тип F	
1	0,8 мл	0,2 мл	-	-	-	-	-
2	0,8 "	-	0,2 мл	-	-	-	-
3	0,8 "	-	-	0,2 мл	-	-	-
4	0,8 "	-	-	-	0,2 мл	-	-
5	0,8 "	-	-	-	-	0,2 мл	-
6	0,8 "	-	-	-	-	-	0,2 мл

3.43. Особое внимание обращают на постановку реакции нейтрализации с сывороткой больного, так как обычно ее бывает не большой объем. Тщательно отделяют сыворотку от сгустка крови (сгусток крови засевают на питательные среды, так как при ботулизме можно обнаружить в крови возбудителя ботулизма) и с сывороткой ставят реакцию нейтрализации. В этом случае ставят развернутую реакцию нейтрализации с моновалентными ботулиническими сыворотками типов А, В, С, Е и F. Для этого в пять пробирок (типа «Эппендорф») поровну разливают всю сыворотку больного, а затем в первую пробирку добавляют диагностическую сыворотку типа А, во вторую – типа В, в третью – типа Е и т.д. Все содержимое каждой пробирки вводят поровну двум мышам. Например, если в каждую пробирку налили по 0,8 мл сыворотки больного, а затем по 0,2 мл диагностической сыворотки, всего в пробирке будет 1,0 мл смеси. Эту смесь вводят внутривентально мышам по 0,5 мл. При получении недостаточного количества сыворотки крови, составляют пропорцию соотношения сыворотки

крови больного к моновалентной ботулинической сыворотки 4:1 и используют минимальное количество реакционной смеси для введения лабораторным животным не менее 0,2 мл (оптимально 0,5 мл). Животные, которым исследуемый материал вводили в смеси с гомологичной сывороткой, остаются живыми, остальные погибают с клиническими признаками ботулизма.

3.44. При получении положительной реакции нейтрализации с диагностическими ботулиническими сыворотками делают заключение о наличии в исследуемом материале ботулинического токсина и указывают его тип.

3.45. Установлено, что противоботулиническая сыворотка типа Е в известной мере нейтрализует и ботулинический токсин типа F. При получении положительной реакции с противоботулинической сывороткой типа Е дополнительно проводят дифференциальную диагностику для более точного определения типа токсина (тип Е или тип F). Для этого ставят реакцию нейтрализации на мышах параллельно с двумя противоботулиническими диагностическими сыворотками типа Е и типа F. Для этого в три пробирки вносят по 2,4 мл испытуемого экстракта, а затем в первую пробирку добавляют 0,6 мл диагностической сыворотки типа Е, во вторую – 0,6 мл типа, в третью, контрольную – 0,6 мл физиологического раствора. Если мыши погибают в контроле и с сывороткой типа Е, то в экстракте имеется токсин типа F, если же погибают наряду с контролем и мыши, которым введена смесь с сывороткой типа F, а выживают только мыши с сывороткой Е, то в экстракте токсин типа Е.

3.46. Для выявления ботулинических токсинов по таблице 4 используют ПП. В две пробирки пипетирующим устройством переносят по 2 – 3 мл, а в третью – 2,7 мл ПП. В последнюю пробирку стерильной пипеткой добавляют 0,3 мл раствора трипсина или панкреатина. В смеси ПП с ферментом с помощью раствора гидроокиси натрия или раствора соляной кислоты устанавливают рН ($6,0 \pm 1$). Затем пробирку со смесью термостатируют при температуре плюс (36 ± 1) °С в течение 1 часа, но не дольше, периодически перемешивают содержимое. Культуральную жидкость, полученную из посевов продуктов в питательную среду, содержащую трипсин или панкреатин, протеолитическим ферментом не обрабатывают. Вторую пробирку с ПП кипятят на водяной бане в течение 10 минут и охлаждают до комнатной температуры. Первую пробирку с ПП оставляют без обработки. ППТ не хранят.

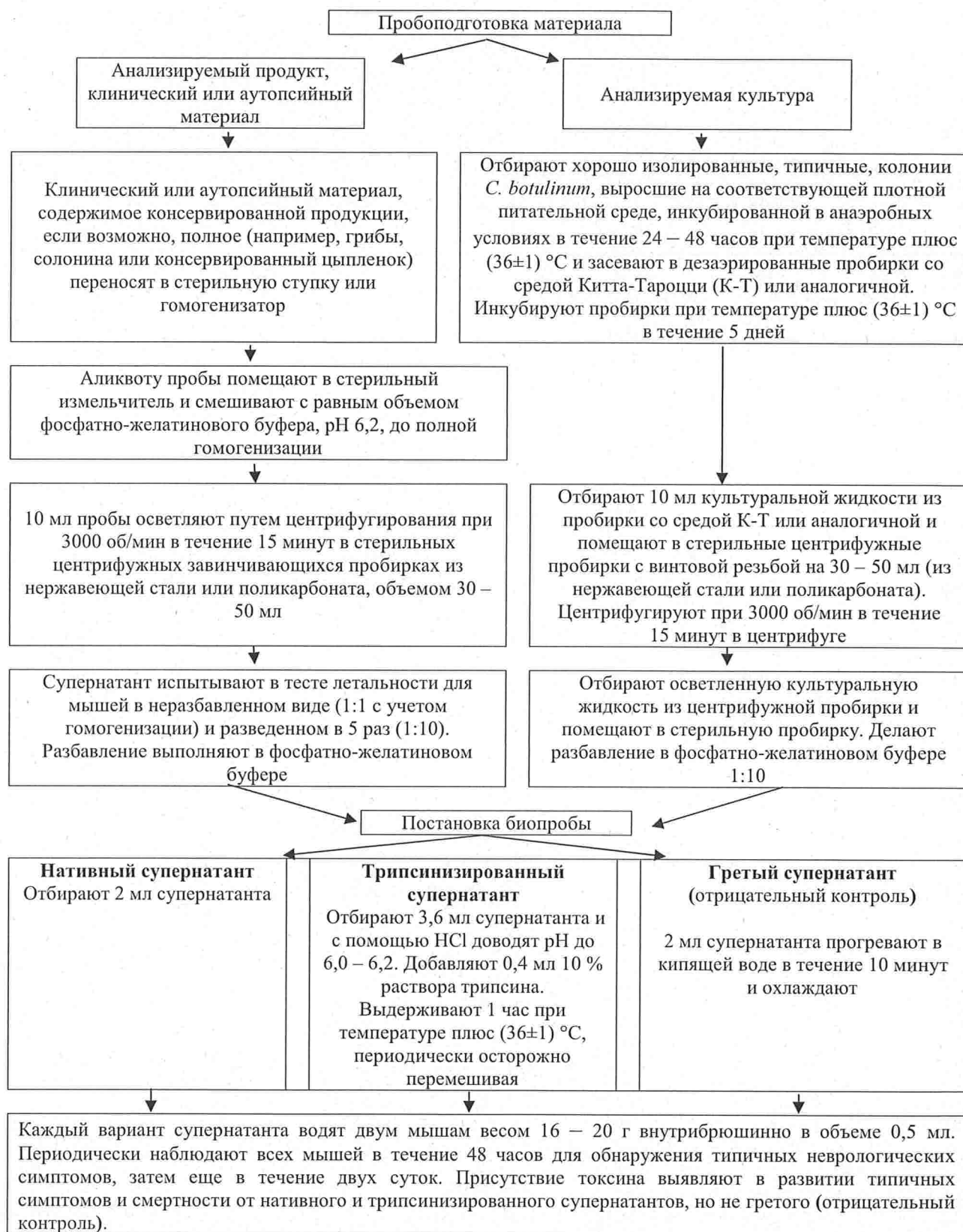


Рисунок 2. Биопроба на мышях с материалом, подозрительным на наличие ботулинического токсина

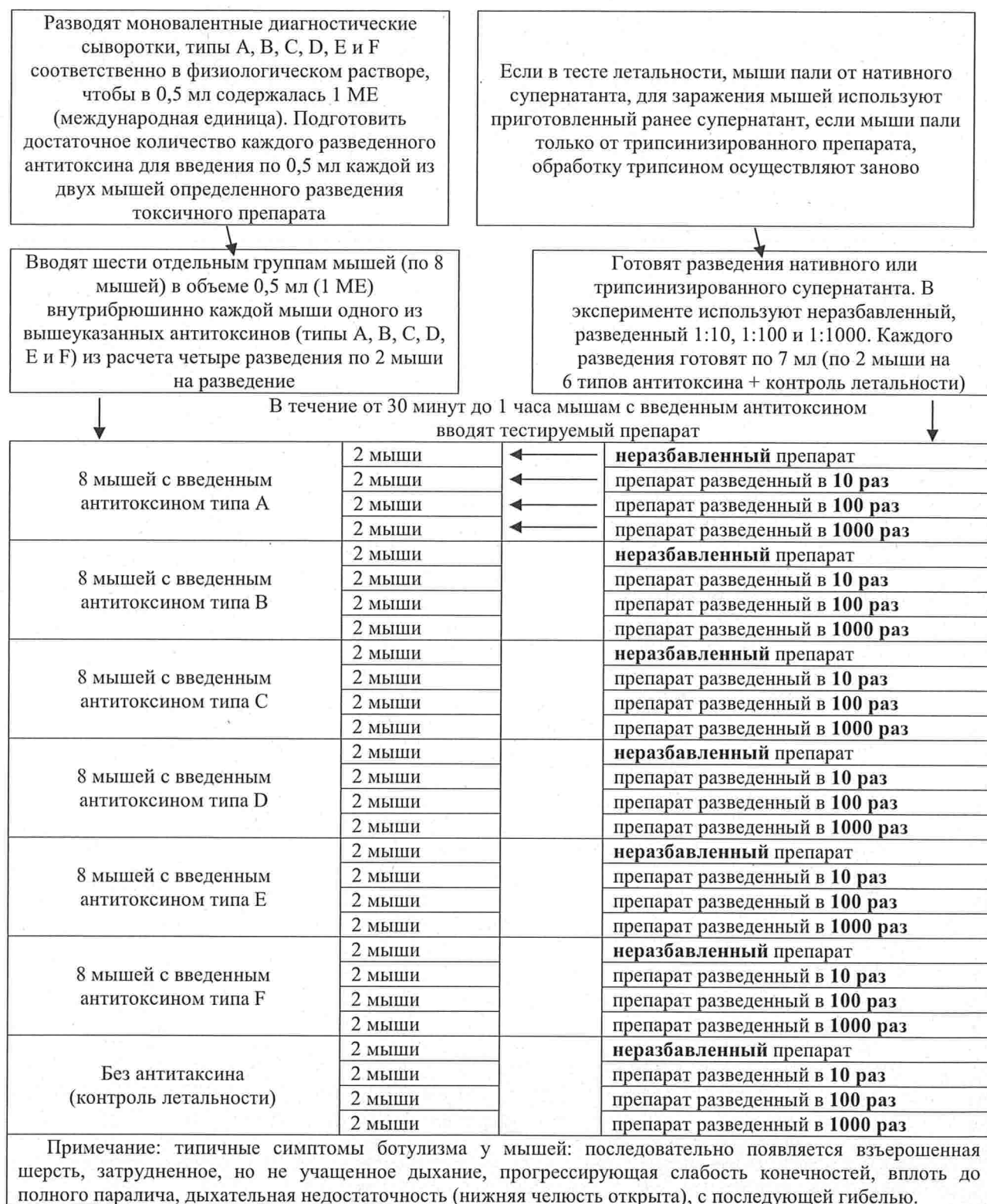


Рисунок 3. Схема постановки реакции нейтрализации с ботулиническими токсинами

Таблица 4

Постановка исследований по обнаружению ботулинического токсина и определению титра токсина в ПП

Цель исследования	Объем ПП, мл	Минимально выявляемое количество токсина в МЛД ПП или ППТ, мл	Способ подготовки ПП для инъекции	Объем ПП для инъекции двум мышам, мл	Количество шприцев, шт	Порядок исследования
Обнаружение ботулинических токсинов	1	Токсин инактивирован	ПП прогретая	0,5 × 2	1	Вначале ставят биологическую пробу с прогретой ПП, затем с ПП и в последнюю очередь с ППТ
	1	2	ПП	0,5 × 2	1	
	1	2	ППТ	0,5 × 2	1	
	0,5	4	0,5 ПП + 0,5 ЖФБ	0,5 × 2	1	При неспецифических симптомах гибели животных в предыдущих вариантах
	0,1	20	0,1 ПП + 0,9 ЖФБ	0,5 × 2	1	
	2	1	Увеличенный объем ПП	1,0 × 2	1	При слабо выраженных симптомах ботулинической интоксикации
	2	1	Увеличенный объем ППТ	1,0 × 2	1	
Определение титра ботулинического токсина	1·10 ⁻²	200	1 ПП (ППТ) + 99 ЖФБ	0,5 × 2	1	Биологическую пробу с ПП или ППТ начинают с наибольшего разведения
	1·10 ⁻¹	20	1 ПП (ППТ) + 9 ЖФБ	0,5 × 2	1	
	0,5	4	1 ПП (ППТ) + 1 ЖФБ	0,5 × 2	1	
	1·10 ⁻⁵	200000	1 ПП (ППТ) + 99999 ЖФБ	0,5 × 2	1	Биологическую пробу с ПП или ППТ начинают с наибольшего разведения
	1·10 ⁻⁴	20000	1 ПП (ППТ) + 9999 ЖФБ	0,5 × 2	1	
	1·10 ⁻³	2000	1 ПП (ППТ) + 999 ЖФБ	0,5 × 2	1	

Примечания: ПП – подготовленная проба; ППТ – подготовленная проба, обработанная протеолитическим ферментом; ЖФБ – буферный желатино-фосфатный раствор. Если предполагается наличие токсина *C. botulinum* E, то разведения более 1 ППТ + 999 ЖФБ не готовят; МЛД – минимальная летальная доза.

Таблица 5

Постановка исследований по обнаружению и типированию ботулинических токсинов

№ опыта	Исследуемый вариант	Типы противоботулинических сывороток	Состояние подопытных мышей	Условия опыта	Наличие и тип ботулинического токсина
1	ПП (ППТ)	Без сывороток	Болеют и обычно погибают со специфическими клиническими симптомами ботулизма	Концентрацию ПП (ППТ) и способ подготовки для инъекции выбирают по таблице 4	Присутствует один или несколько типов ботулинических токсинов
2	ПП (ППТ)	Трехвалентная типов А, В, Е	Живы	Мыши в первом варианте погибли	Тип А, В или Е (F)* или их комбинации
3	ПП	Моновалентная типа А	"	То же	Тип А
4	ПП	Моновалентная типа В	"	"	Тип В
5	ПП (ППТ)	Моновалентная типа Е	"	"	Тип Е (тип F)*
6	ПП (ППТ)	По таблице 4	Живы мыши, получившие гомологический тип сыворотки	"	Один или несколько типов токсина, соответствующих типу (типам) сывороток, защитивших мышей от гибели
Примечание: ПП – подготовленная проба; ППТ – подготовленная проба, обработанная протеолитическим ферментом; * – при перекрестной реакции с сывороткой типа Е.					

3.47. Непосредственно после окончания обработки ППТ ставят биологическую пробу на белых мышах. По 0,5 – 1,0 мл подготовленной соответствующим образом пробы вводят в зависимости от условий опыта внутривенно (сыворотку внутривенно) не менее чем двум белым мышам, в соответствии с приложением 1 к настоящему МУ. Животных осматривают через 1, 2, 4, 12 часов и далее не менее двух раз в день в течение 72 часов. Ботулинические токсины обычно не вызывают молниеносной гибели животных; клинические симптомы ботулинической интоксикации животных токсином типа Е, как правило, появляются через 2 – 4 часа, токсином других типов – через 10 – 12 часов после инъекции. Высокие концентрации токсина могут вызвать гибель мышей в течение 1 – 2 часа, редко в течении 2 – 3 минут без проявления характерной клиники ботулизма. В этом случае ставят повторно биологическую пробу с исходной жидкостью, разведенной в 10 – 100 раз. При разведении проб посторонняя микрофлора теряет способность вызывать гибель мышей, а ботулинические токсины, обладая обычно большей биологической активностью, будут вызывать гибель мышей даже при разведении фильтратов. Мыши болеют и погибают не раньше, чем через 2 часа после инъекции токсина, чаще всего в течение 4 – 6 часов. Клинические симптомы болезни и гибели мышей при ботулинической интоксикации характерны: шерсть взъерошивается, дыхание затруднено, мышцы брюшной стенки ослаблены и западают, давая симптом «осиная талия»; появляются судороги, паралич задних конечностей; гибель при явлениях полного паралича из-за остановки дыхания.

3.48. При наличии в ПП ботулинического токсина болеют и погибают с клиническими симптомами ботулинической интоксикации те животные, которым введена необработанная протеолитическим ферментом проба, и, если фермент не инактивировал ботулинический токсин, то болеют и погибают животные, которым введена проба, обработанная протеолитическим ферментом. При наличии в ПП ботулинических протоксинов болеют и погибают с клиническими симптомами ботулинической интоксикации в первую очередь те животные, которым введена обработанная ферментом проба; мыши, которым введена не обработанная ферментом проба, могут переболеть, но не погибают или погибают позже. Мыши, которым введена термически обработанная проба, остаются на всем протяжении опыта здоровыми. Если болеют или погибают мыши, получившие термически обработанную и непрокипяченную пробу, то ПП разводят буферным желатино-фосфатным раствором в соотношении 1:1 и 1:9 и повторяют исследования по вышеописанному методу с тем, чтобы избежать гибели животных от термически обработанной пробы или подтвердить, что клинические признаки гибели животных по всем вариантам опыта не соответствуют признакам ботулинической интоксикации.

3.49. При наличии в ПП ботулинических токсинов все последующие исследования проводят с необработанной пробой; ботулинических протоксинов – с ППТ.

Определение титра ботулинического токсина³⁰

3.50. Для определения титра ботулинического токсина используют ПП, содержащую ботулинический токсин, или ППТ. Пипетирующим устройством по 1 мл ПП или ППТ, переносят в две пробирки; в одну стерильной пипеткой добавляют 1 мл, получая разведение 1:1, в другую – 9 мл буферного желатино-фосфатного раствора, получая разведение 1:9. Из пробирки с пробой, разведенной в 10 раз, пипетирующим устройством отбирают 1 мл и переносят в третью пробирку, в которую стерильным пипетирующим устройством добавляют 9 мл раствора желатино-фосфатного буфера, получая разведение 1:99. При ограниченном объеме ПП из нее готовят те же разведения, но получают вышеуказанные соотношения между исходной жидкостью и желатино-фосфатным буфером, используя меньший объем ПП и раствора желатино-фосфатного буфера. С полученными разведениями ПП (или ППТ) ставят биологические пробы в порядке, приведенном в таблице 4. Опытным путем подбирают такие разведения ПП или ППТ, при введении которых погибают все мыши, и последующие разведения, при которых мыши не погибают. Если использование 10-кратных разведений не приводит к гибели всех мышей ни в одном из разведений, то для определения титра ботулинического токсина готовят 6- или 4-кратные разведения ПП или ППТ. По наибольшему разведению пробы, вызвавшему гибель всех мышей, вычисляют число мышиных минимальных летальных доз (далее – МЛД) ботулинического токсина в 1 мл ПП с последующим пересчетом на продукт.

Серологическое типирование токсина *C. botulinum*³¹

3.51. Подтверждение присутствия и установление типа ботулинического токсина путем постановки реакции нейтрализации на мышах. Присутствие ботулинического токсина в ПП обнаруживают путем постановки биологической пробы на мышах с их иммунизацией противоботулиническими антитоксическими сыворотками типов А, В, Е, С, D, Е, F. Сыворотка типа С содержит антитоксины типов С₁ и С₂. Поливалентные сыворотки и типы поливалентных сывороток для опыта подбирают в зависимости от вида анализируемого продукта или материала и предполагаемого типа ботулинического токсина в соответствии с комбинациями и порядком, приведенными в таблицах 6 – 7.

³⁰ ГОСТ 10444.7-86.

³¹ ГОСТ 10444.7-86.

**Подбор противоботулинических сывороток для типирования
ботулинических токсинов в ПП**

№ варианта опыта	Анализируемый продукт, материал	Типы используемых противоботулинических сывороток и их комбинации	Типы выявляемых ботулинических токсинов или их комбинации
1	Не прошедший термическую обработку	Моновалентные типов А, В, Е и трехвалентная типов А, В, Е	А, В, Е(Ф) А+В+Е(Ф)
2	Тот же, не содержащий ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемых по 1 варианту опыта	Моновалентная типа F	F(Е)
3	Прошедший термическую обработку	Моновалентная типа С Моновалентная типа А и В, бивалентная АВ	С(Д) А; В; А+В
4	Тот же, не содержащий типы ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемых по 3 варианту опыта	Моновалентная типа F	F(Е)
5	Любой, не содержащий типы ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемых по 1-4 вариантам опыта	Моновалентная типа Е Моновалентная типа С Бивалентные типы: АС	Е(Ф) С(Д) А+С(Д)
		АЕ АF ВС ВЕ ВF СЕ СF ЕF	А+Е(Ф) А+F(Е) В+С(Д) В+Е(Ф) В+F(Е) С(Д)+Е(Ф) С(Д)+F(Е) Е+F
	Любой, не содержащий типы ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемые по 1-4 вариантам опыта	Трехвалентные типы: АВF	А+В+F(Е)
		ВСЕ ВCF и другие Поливалентная типа АВCEF Моновалентная типа D	В+С(Д)+Е(Ф) В+С(Д)+F(Е) и другие А+В+С(Д)+Е+F D(С)
6	Тот же, не содержащий типы ботулинических токсинов или их комбинаций, выявляемые по 1-5 вариантам опыта	Моновалентная типа G Поливалентная типов А, В, С, D, Е, F	G (А+В+С+D+Е+F+G) и другие комбинации, в соответствии комбинациями использованной сыворотки

Примечание:

- исследование начинают с использования комбинации с наибольшим количеством типов сывороток, и в случае, если использованная комбинация типов сывороток защищает мышей от гибели, типировать ботулинические токсины моно-, би- или трехвалентными сыворотками, указанными в соответствующем варианте опыта;
- в скобках указана возможная перекрестная реакция при типировании ботулинических токсинов.

3.52. Для типирования с помощью реакции нейтрализации используют противоботулинические антитоксические типоспецифические сыворотки, разведенные физиологическим раствором до концентрации 1 МЕ/мл. Разведенные сыворотки хранят при температуре плюс (4±2) °С в течение не более 10 суток.

Если при использовании сывороток, разбавленных до 1 МЕ/мл, установить тип ботулинического токсина не удастся, то биологическую пробу повторяют с сыворотками, разбавленными до концентрации 0,1 МЕ/мл. При использовании противоботулинических антитоксических типоспецифических сывороток, содержащих 1 МЕ/мл, ПП (и (или) ППТ) разводят буферным желатино-фосфатным раствором в соотношениях, позволяющих получить не менее трех последовательных разведений жидкости, содержащей в 10, 100 и 1000 раз меньше МЛД, чем обнаружено в ПП.

3.53. При постановке защитного теста для типирования ботулинических токсинов каждому животному внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл моновалентной, двух-, трех- или поливалентной сыворотки. Для инъекции одного типа сыворотки или их смеси каждой группе животных применяют отдельный шприц. Через 60 минут после введения сывороток животным вводят ПП. Введение животным ПП начинают с наибольшего ее разведения, используя один шприц для группы мышей, получивших моновалентную сыворотку одного типа или двух-, трех- или поливалентную сыворотку, состоящую из одной комбинации моновалентных сывороток.

3.54. При наличии в ПП ботулинического токсина болеют и погибают с клиническими симптомами ботулинической интоксикации те мыши, которым введена сыворотка, не гомологичная типу ботулинического токсина в исходной жидкости. Погибают также мыши, которые получили гомологичную сыворотку в объеме, недостаточном для защиты от высокой дозы токсина. Мыши, получившие сыворотку, в состав которой входит моновалентная сыворотка, гомологичная типу ботулинического токсина в ПП, остаются живы.

Если болеют и погибают все животные, то биологическую пробу повторяют, применяя более разбавленную ПП или ранее не использованные комбинации моновалентных сывороток.

Подтверждение присутствия и установление типа ботулинического токсина реакцией нейтрализации³²

3.55. Присутствие ботулинического токсина в ПП подтверждают реакцией нейтрализации с концентрированными противоботулиническими антитоксическими сыворотками в случаях, когда имеется для этого достаточное количество сывороток и ПП содержит более 4 мышиных МЛД/мл. Допускается одновременное установление присутствия и типа ботулинического токсина путем постановки развернутой реакции нейтрализации.

3.56. Концентрированные сыворотки применяют при необходимости с целью подтверждения присутствия ботулинических токсинов в ПП в наиболее короткий срок с наименьшим количеством животных без предварительного определения титра ботулинического токсина.

3.57. Непосредственно перед использованием ампулы с сухими сыворотками вскрывают, добавляют в каждую ампулу 1 мл стерильной дистиллированной воды и, легко встряхивая, добиваются полного растворения

³² ГОСТ 10444.7-86.

сыворотки. Затем сыворотки типов А, В, С, Е разводят в 10 раз, а сыворотки типа F – в 5 раз физиологическим раствором. Хранят при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение не более 10 суток.

3.58. При использовании диагностических сывороток присутствие ботулинических токсинов в подготовленной пробе ПП или ППТ, подтверждают реакцией нейтрализации. Для проведения реакции нейтрализации в чистую пробирку пипетирующим устройством переносят 2,4 мл исходной жидкости или исходной жидкости, обработанной протеолитическим ферментом. Затем в нее вносят по 0,12 мл сывороток пяти типов *C. botulinum*, или по 0,15 мл сывороток четырех типов *C. botulinum*, или по 0,2 мл трех типов *C. botulinum*. Каждый тип сыворотки отбирают для приготовления поливалентной сыворотки отдельной стерильной микропипеткой. После выдержки в течение 30 – 45 минут приготовленную смесь вводят по 1 мл белым мышам. В случае гибели животных реакцию повторяют с ПП или ППТ, разбавленной буферным желатино-фосфатным раствором в соотношении 1:9, а в случае необходимости – в большей степени.

3.59. Для установления типа ботулинического токсина с помощью диагностических сывороток пипетирующим устройством по 2,4 мл (допускается не менее 0,8 мл) подготовленной жидкости или жидкости, обработанной протеолитическим ферментом, разливают в несколько пробирок, затем в каждую пробирку отдельными стерильными пипетками добавляют по 0,6 мл (допускается не менее 0,2 мл) моновалентных сывороток для типирования ботулинического токсина одного типа, по 0,3 мл моновалентных сывороток для типирования смеси ботулинических токсинов двух типов и по 0,2 мл моновалентных сывороток для типирования смеси ботулинических токсинов трех типов в соответствии с таблицей 6. В случаях, если необходимо избежать перекрестных неспецифических реакций с негомологичными сыворотками для разделения ботулинических токсинов типов Е и F, С и D и других типов, концентрированные сыворотки разводят до концентрации 1 (0,1) МЕ/мл.

3.60. Для постановки развернутой реакции нейтрализации и типирования ботулинического токсина сыворотками после их разведения *in vitro* в пробирку пипетирующим устройством переносят ПП или ППТ и, при необходимости, готовят одной пипеткой в пробирках серию разведений этой жидкости в соотношении, подобранном ранее. Затем пипетирующим устройством последовательно, начиная с наибольшего разведения, переносят по 2,4 мл (допускается не менее 0,8 мл) из каждого разведения жидкости в серию из нескольких пробирок. Количество пробирок для каждого разведения соответствует числу типов моно-, двух-, трех- и поливалентных комбинаций сывороток, используемых в реакции нейтрализации и типировании ботулинических токсинов. В каждую серию пробирок с разведенной исходной жидкостью, начиная с наибольшего разведения, стерильной пипеткой добавляют по 0,6 мл (допускается не менее 0,2 мл) моно-, двух-, трех- или поливалентной сыворотки одного состава. Приготовленные смеси выдерживают в течение 30 – 45 минут при комнатной температуре. После окончания выдержки по не менее 0,5 мл смеси, отобранной от каждой пробирки, вводят двум белым мышам. Мыши, которые получили смеси, содержащие моно-, двух-, трех- или

поливалентные сыворотки, гомологичные типу ботулинического токсина или нескольким типам ботулинического токсина, содержащегося в исходной жидкости, остаются живы; мыши, не получившие сыворотки гомологического типа, болеют и погибают с симптомами ботулинической интоксикации. Допускается одновременно подсчитывать титр токсина.

Бактериологическое исследование³³

3.61. Для диагностики ботулизма у больных и при санитарно-эпидемиологических исследованиях продуктов и других объектов окружающей среды проводят бактериологическое исследование для выделения и идентификации возбудителя ботулизма (*C. botulinum*, *C. argentinense*, *C. baratii* или *C. butyricum*) и (или) типирование микроорганизмов с целью определения токсина и его типов в рвотных массах/промывных водах желудка и в других видах материалов (рисунок 1, таблица 7)³⁴.

Клостридии являются облигатными анаэробами, важным условием, которое соблюдают на всех этапах выделения и идентификации анаэробов, является защита этих микробов от токсического действия молекулярного кислорода. Время между взятием материала и его посевом на питательные среды должно быть максимально коротким, важно не допускать сильного перемешивания образца перед тестированием, чтобы не увеличивать содержание в нем кислорода. Разведение образцов проводят в свежеприготовленных растворах с минимально возможным содержанием кислорода. Посевы следует как можно быстрее инкубировать в анаэробных условиях. При наличии анаэробных станций все манипуляции с образцами проводят в них, следуя инструкции по эксплуатации.

Для создания анаэробных условий используют анаэростаты с газовой смесью для культивирования анаэробов, которая состоит из 80 % азота, 10 % водорода и 10 % углекислого газа. Такой состав создается либо механически за счет удаления (откачивания) воздуха из анаэростата и последующего заполнения газовой смесью, либо химическим способом при использовании специальных газогенерирующих пакетов. Активация газогенерирующих пакетов происходит в соответствии с инструкцией производителя.

При работе с жидкими и полужидкими средами анаэробные бактерии культивируют только на специальных бескислородных средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом (10 – 150 мВ), содержащих редуцирующие вещества. Для поддержания низкого окислительно-восстановительного потенциала такие среды разливают в пробирки или флаконы высоким столбиком (высотой примерно 10 см). В качестве редуцирующих веществ используют кусочки животных тканей (печень, мозг, почки, селезенка), которые связывают растворенный в среде кислород и адсорбируют бактерии. Основной среди них является среда Китта-Тароцци – жидкая или полужидкая среда, содержащая в своем составе печень, мясо или рыбу (англ. Cooked Meat

³³ Клинические рекомендации 2025-2026-2027.

³⁴ Клинические рекомендации – Ботулизм у детей – 2024 (30.09.2024) – Утверждены Минздравом Российской Федерации (далее – Ботулизм у детей – 2024); ГОСТ 10444.7-86.

Medium). Для выделения облигатных анаэробов широко используются питательные среды, содержащие такие восстановители, как тиогликолят натрия, цистеина гидрохлорид, сульфит натрия, дитиотреитол и дитионит натрия. Для контроля за степенью насыщения кислородом в состав питательных сред добавляют специальные редокс-индикаторы (метиленовый синий, резазурин). Примером питательной среды, содержащей восстановители и индикатор, может служить используемая для проведения испытаний на стерильность тиогликолевая среда, которая обеспечивает рост как аэробных, так и облигатных анаэробных микроорганизмов.

Таблица 7

**Схема посева пищевых продуктов на питательные среды для выделения
*C. botulinum***

№ навески	Пищевой продукт	Питательная среда для посева	Обработка посевов	Температура термостатирования, °С
1	Любой, кроме консервов, при подозрении на присутствие вегетативных клеток <i>C. botulinum</i> типов А, В, С, D, Е, F, разлагающих казеин	Китта-Тароцци, печеночно-глицериновая; улучшенная клостридиальная среда с кусочками вареного мяса; тиогликолевая среда	Без обработки	плюс 36±1
2	Консервы	То же	То же	плюс 30±1
3	Любой, кроме консервов, при подозрении на присутствие спор <i>C. botulinum</i> типов А, В, С, D, Е, F, разлагающих казеин	То же	Прогрев при температуре плюс (60±1) °С или при температуре плюс (80±1) °С в течение 15 мин, обработка 96 % этиловым спиртом	плюс 36±1
4	Консервы	То же	То же	плюс 30±1
5	Любой при подозрении на присутствие <i>C. botulinum</i> типов А, В, С, D, Е, F, не разлагающих казеин	Триптиказо-пептонно-глюкозная с дрожжевым экстрактом; тиогликолевая среда., бульон Хоттингера, с добавлением трипсина	Без обработки	плюс 30±1*
6	Любой при подозрении на присутствие спор <i>C. botulinum</i> типов А, В, С, D, Е, F, не разлагающих казеин; навеску продукта обрабатывают спиртом	То же, но без добавления трипсина	То же	плюс 30±1*

Примечание: * – при подозрении на присутствие психротрофных штаммов *C. botulinum*, посевы термостатируют при температуре плюс (26±1) °С.

При бактериологическом исследовании материала от больных на ботулизм, а также продуктов питания и других объектов окружающей среды используют среды обогащения (например, среду Китта-Тароцци) и плотные питательные среды. Плотные среды готовят с добавлением антибиотиков (для подавления сопутствующих микроорганизмов), а также желточной эмульсии (для выявления липазной активности у *C. botulinum*) или крови.

Лецитиназа, характерная для *C. botulinum* типов С и D расщепляет лецитин, образуя нерастворимый непрозрачный осадок в среде, окружающей рост. Липаза, наиболее характерная для *C. botulinum* (типы А, В, С, D, Е, F) расщепляет свободные жиры в яичном желтке, в результате чего поверхность колоний приобретает радужный (жемчужный) блеск. Исключение составляют представители *C. botulinum* типа G (*C. argentinense* типа G), у которых отсутствует липазная активность. Другие представители группы: *C. butyricum* и *C. baratii* не обладают ни лецитиназной, ни липазной активностью.

На средах с бараньей кровью у многих штаммов *C. botulinum* выявляют β-гемолиз, который вызван выработкой ботулинолизина. Однако существует много штаммов, которые не продуцируют этот токсин, и не проявляют гемолитической активности в среде с кровавым агаром.

В работе могут быть использованы среды, предназначенные для выявления клостридий по сульфитредуцирующему признаку, на которых *C. botulinum* при глубинном посеве формируют черные колонии, а при поверхностном посеве центр колоний может быть окрашен в черный цвет. Перечень питательных сред, возможных к применению при диагностике ботулизма приведен в приложении 2 к настоящим МУ.

3.62. Каждую навеску, приготовленную для бактериологического исследования по п. 3.31, высевает по 0,1 – 0,2 мл на плотные питательные среды и на среды обогащения (в соотношении 1:9). Количество засеянных питательных сред всех наименований рассчитывают с учетом инкубации в анаэробных условиях при двух температурах: плюс (30±1) °С и плюс (36±1) °С.

Если в исследуемом материале возбудители ботулизма находятся преимущественно в вегетативной форме, то рост возможен, главным образом, из необработанных образцов. В случае, если в материале имеются споровые формы, то вероятнее получить рост из обработанных образцов, и в отдельных случаях сразу выделить чистую культуру. После посева все исходные образцы проб следует сохранять до окончания исследования в холодильнике при температуре плюс (2 – 8) °С.

Для выявления *C. botulinum* типа Е в среду следует добавлять трипсин до конечной концентрации 0,1 % (приложение 2 к настоящим МУ).

3.63. Рост возбудителя ботулизма на средах обогащения характеризуется нередко сильным газообразованием и иногда протеолизом кусочков печени или фарша. При исследовании нестерильного в норме клинического материала помутнение среды после инкубации может быть связано с ростом микробов-ассоциантов.

Рост *C. botulinum* на плотных селективных средах с желточной эмульсией характеризуется образованием выпуклых шероховатых, немного расплывчатых с неровными краями, окруженных узкой «жемчужной» (радужной) зоной (шириной примерно 1 – 2 мм), повторяющей контур колоний. На кровавом агаре

C. botulinum формирует серые колонии с неровными краями, полупрозрачные или непрозрачные; чаще с узкой зоной β -гемолиза, проявление которого зависит от температуры инкубации.

В случае появления признаков микробного роста на средах обогащения через 24 – 48 часов инкубации производят пересев на плотные среды. При одновременном появлении на плотных средах типичных колоний *C. botulinum* из одних и тех же образцов клинического материала их пересев не производят.

Со сред обогащения с признаками роста и из колоний, подозрительных или типичных для *C. botulinum*, готовят препараты для световой микроскопии – «раздавленная» капля и мазки с окраской по Граму для выявления типичных клеток с терминально расположенными спорами овальной формы в виде «теннисной ракетки». В мазках, приготовленных из свежевыросших колоний, выявляют только вегетативные формы – крупные грамположительные палочки с закругленными концами. В мазках, сделанных из колоний, хранившихся на воздухе при комнатной температуре более 6 – 8 часов, и в препаратах «раздавленная капля», хранившихся в течение суток в закрытых чашках Петри, наблюдают клетки со спорами.

3.64. Выросшую культуру идентифицируют по морфологическим и тинкториальным свойствам, ферментативной активности (в том числе с использованием зарегистрированных тест-систем), белкового профиля (высокопроизводительная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией (англ. Matrix-Assisted Lazer Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry, далее – MALDI-ToF MS), методика применения MALDI-TOF MS описана в п. 3.79) и в реакции нейтрализации на мышах с противоботулиническими сыворотками. Результаты высокопроизводительной MALDI-TOF MS сопоставляют с результатами реакции нейтрализации.

3.65. Обнаружение в культуральной жидкости ботулинического токсина или протоксина и клостридиальных клеток указывает на присутствие в посеве токсигенного штамма *C. botulinum*. Устанавливают тип обнаруженного токсина или протоксина и тем самым тип *C. botulinum*, присутствующего в посеве. С культуральной жидкостью или культурой, выросшей на плотных средах, ставят реакцию с поливалентной противоботулинической сывороткой типов А, В, С, D, Е и F. При получении положительных результатов реакцию нейтрализации ставят с каждой сывороткой отдельно. Если через двое суток во флаконах не обнаружен рост, то необходимо продолжать инкубацию в термостате, а исследование повторить на 4 – 6 – 10 сутки. При обнаружении в исследуемом посеве палочек, типичных по морфологии для *C. botulinum*, а также ботулинического токсина дается заключение о зараженности исследуемого материала возбудителем ботулизма. Выделение чистой культуры в таком случае не является обязательным.

3.66. Если же в посевах обнаруживают микроорганизмы, по морфологии схожие с *C. botulinum*, а токсин отсутствует, проводят активацию культуральной жидкости панкреатином или трипсином по описанной ниже методике для обнаружения ботулинического токсина, а также проводят выделение и изучение чистой культуры. Активацию культуральной жидкости перед постановкой реакции нейтрализации с противоботулинической сывороткой проводят только в

том случае, если в среду перед высевом не был добавлен трипсин или панкреатин, как это рекомендовано выше.

3.67. Данный метод позволяет подтвердить диагноз через 4 – 5 дней от момента забора материала.

Обработка результатов

3.68. При проведении биологической пробы у одной из особей мышей, получившей жидкий продукт, жидкую фракцию или экстракт из продукта, выявляют клинические симптомы, характерные для ботулинической интоксикации, при сохранности мышей, получивших термически обработанный жидкий продукт, термически обработанную жидкую фракцию или термически обработанный экстракт из продукта, считают, что в продукте содержится ботулинический токсин.

3.69. Если после предварительной обработки протеолитическим ферментом обнаружен токсин или его количество в продукте увеличилось, то считают, что в продукте содержится ботулинический протоксин.

3.70. Если при проведении биологической пробы все мыши остаются живы, то считают, что ботулинические токсины и протоксины в навеске проанализированного продукта содержатся в количестве менее минимального количества токсина, которое можно обнаружить в анализируемом продукте (Х-МЛД), или отсутствуют.

3.71. Если мыши погибли ранее, чем через 2 часа после постановки биологической пробы с разведенной исходной жидкостью без проявления клинических симптомов ботулинической интоксикации, то указывают, что определить присутствие в анализируемом продукте ботулинического токсина по данной методике не представляется возможным.

3.72. Если в результате защитного теста или реакции нейтрализации ботулинических токсинов или протоксинов противоботулиническими антитоксическими сыворотками мыши, получившие при постановке биологической пробы только исходную жидкость продукта, а получившие исходную жидкость продукта с моновалентной или двух-, трех- или поливалентной сывороткой, остаются живы, то считают, что в продукте содержится один или несколько ботулинических токсинов или протоксинов.

3.73. Если нейтрализовать и (или) типировать ботулинический токсин в продукте и (или) в культуральной жидкости не удалось, то указывают, что при проведении биологической пробы мыши погибли с клиническими симптомами ботулинической интоксикации. При этом указывают также типы и концентрации использованных противоботулинических антитоксических сывороток, разведение продукта или культуральной жидкости и раствор, применяемый для получения экстракта продукта.

3.74. Если при типировании ботулинических токсинов или протоксинов мыши, получившие исходную жидкость продукта, погибли с клиническими симптомами ботулинической интоксикации и не погибли мыши, получившие исходную жидкость продукта с противоботулиническими антитоксическими типоспецифическими сыворотками, то считают, что в продукте присутствуют

ботулинический токсин или смесь ботулинических токсинов тех типов, которым соответствует сыворотка, нейтрализовавшая токсин и предохранившая животных от гибели.

3.75. Если проводилось титрование ботулинического токсина, то указывают количество (титр) обнаруженного токсина в 1 мл или г продукта в единицах МЛД.

3.76. При обнаружении в культуральной жидкости посева хотя бы в одной из навесок продукта клостридий и ботулинического токсина или протоксина считают, что в продукте присутствует токсигенный штамм *C. botulinum*. Результаты исследования ботулинического токсина в культуральной жидкости посева продукта оценивают аналогично исследованию ботулинических токсинов в продукте.

3.77. Если проводилось выделение токсигенных штаммов *C. botulinum*, то при обнаружении в посевах хотя бы одной колонии клостридий, способной образовывать ботулинический токсин или протоксин, считают, что в продукте присутствует токсигенный штамм *C. botulinum*.

3.78. При обнаружении в посевах колоний клостридий, не способных образовывать ботулинический токсин или протоксин, считают, что в продукте токсигенные штаммы *C. botulinum* отсутствуют. Результаты исследования ботулинического токсина в культуральной жидкости выделенного штамма оценивают аналогично исследованиям ботулинических токсинов в продукте.

Идентификация с использованием высокопроизводительной MALDI-TOF MS

3.79. Идентификацию чистой культуры с использованием высокопроизводительной MALDI-TOF MS проводят как со штаммами, выделенными от больных, так и при работе со штаммами, выделенными из пищевых продуктов и объектов окружающей среды. Работы с микроорганизмами проводят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями³⁵. Учитывая, что возбудители ботулизма являются спорообразующими бактериями, методика подготовки и обеззараживания проб для исследования методом MALDI-TOF MS колоний, подозрительных на возбудителя ботулизма, соответствует методическим документам³⁶. Для идентификации микроорганизмов подготовку проб проводят в боксе биологической безопасности не ниже II класса в «заразной зоне» лаборатории. Используют свежевыращенные культуры микроорганизмов, культивирование которых проводят на плотных питательных средах при температуре плюс $(30 \pm 1) - (36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 – 48 и более часов. Пробоподготовку и идентификацию *C. botulinum* проводят в соответствии с

³⁵ Пункты 318 – 341 СанПиН 3.3686-21.

³⁶ МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности», утвержденные руководителем Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 24.04.2014.

инструкциями производителей конкретных моделей приборов MALDI-TOF. Отклонение от инструкции может повлечь технические сбои в работе прибора, получение ложного результата, а также возможный отказ от дальнейшего технического обслуживания. В целом, инструкция для проведения пробоподготовки бактерий, выглядит следующим образом: предварительно готовят реактивы, в том числе 70 % этиловый спирт, 80 % трифторуксусную кислоту, 70 % водный раствор муравьиной кислоты, свежий раствор матрицы (α -циано-4-гидроксикоричневая кислота); проводят калибровку прибора в соответствии с инструкцией. Для идентификации используют метод экстракции белков с применением муравьиной кислоты и трифторуксусной кислоты, для этого одну колонию микроорганизма переносят в пробирку типа «Эппендорф» с 300 мкл воды и встряхивают на вортексе в течение 1 минуты, добавляют 900 мкл 96 % этанола и встряхивают в течение 1 мин, центрифугируют в течение 2 минут при скорости вращения 11000 об/мин, супернатант удаляют, осадок высушивают на воздухе; суспендируют в 20 – 80 мкл 70 % водного раствора муравьиной кислоты, затем добавляют эквивалентный объем 100 % ацетонитрила, 1 мкл полученного супернатанта наносят на металлическую мишень масс-спектрометра и высушивают при комнатной температуре; на поверхность высушенного супернатанта наносят 1 мкл раствора матрицы (раствор α -циано-4-гидроксикоричневая кислоты в водном растворе 50 % ацетонитрила и 2,5 % трифторуксусной кислоты) и высушивают при комнатной температуре. Идентификацию осуществляют путем биоинформационного анализа полученных спектров белков с референсными спектрами базы данных. Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) используют 5 лунок для получения достоверного результата.

Метод ИФА для выявления ботулотоксинов³⁷

3.80. Наиболее распространенным иммунологическим тестом для выявления ботулотоксинов является ИФА. Материалом для исследования при постановке ИФА могут быть сыворотка, плазма, гомогенат из органов, клеточные лизаты, различные пищевые продукты, объекты окружающей среды. Из образцов готовят аликвоты, которые хранят при температуре минус 20 °С в течение не более 3 месяцев или при температуре минус 80 °С в течение не более 6 месяцев. В случае использования образцов в течение 24 часов, допускается их хранение при температуре плюс (4±1) °С. Образцы, в которых предполагается наличие токсина, добавляют к токсинспецифическим поликлональным или моноклональным антителам. Комплексы токсин-антитело выявляют, используя второе токсинспецифическое антитело, связанное с ферментом (фосфатазой или пероксидазой), генерирующим световой сигнал посредством ферментативного расщепления хромогенного субстрата. С развитием методов усиления сигнала ИФА этот метод по чувствительности сравним с биопробой. Существует вариант метода ИФА для обнаружения нейротоксинов *C. botulinum* типов А, В, Е и F. В анализе используют поликлональные антитела, специфичные к указанным типам

³⁷ Клинические рекомендации 2025-2026-2027.

токсинов, в качестве вторичных антител применяют дигоксигенин. Этот метод детектирования требует добавления хромогенного субстрата и антител против дигоксигенина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Чувствительность этого теста для токсина А, обнаруженного в различных образцах пищевых продуктов, составила ~ 60 пг/мл. Недавно разработан метод ИФА для одновременного обнаружения нейротоксинов серотипов А, В, С, D, Е и F с чувствительностью $\sim 0,2$ пг/мл.

3.81. Постановку и учет результатов ИФА осуществляют согласно инструкции производителя по применению диагностической иммуноферментной тест-системы для определения ботулинических токсинов. Алгоритм проведения исследований приведен в п.п. 3.82 – 3.93.

3.82. Перед использованием набора доводят температуру всех реагентов до комнатной, сразу после использования охлаждают все реагенты до температуры плюс (4 ± 1) °С. В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета. Воспроизводимость результатов ИФА существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. На всех стадиях инкубации избегают воздействия прямого солнечного света. При инкубации прикрывают планшет крышкой.

3.83. Приготовление моющего буфера. Для приготовления моющего буфера смешивают 1 часть концентрированного моющего буфера и 99 частей дистиллированной воды (например, 10 мл концентрата и 990 мл деионизированной или дистиллированной воды). Если во флаконе с концентрированным буфером образовались кристаллы, предварительно их растворяют, нагревая флакон в водяной бане при температуре плюс (37 ± 1) °С. Хранят готовый моющий буфер при температуре плюс (4 ± 1) °С не более двух недель. Температуру моющего буфера перед его использованием доводят до комнатной.

Проведение анализа

3.84. Вставляют в рамку планшета стрипы с адсорбированными антителами в количестве, соответствующем числу проб, подготовленных для анализа. Добавляют по 100 мкл исследуемого раствора в лунки соответствующего стрипа, в лунки добавляют по 100 мкл положительного контроля (стандарта, который заранее аккуратно встривают или пипетируют 3 раза пипеткой), 100 мкл фосфатно-солевой буфер (англ. Phosphate buffered saline, PBS в контрольную лунку; добавляют по 10 мкл в образцы (добавляют в случае работы с супернатантами из бактериальных клеток, биологическими жидкостями, гомогенатами тканей; не добавляют в случае работы с сывороткой или плазмой) балансового раствора, хорошо перемешивают; добавляют по 50 мкл конъюгата в каждую лунку (за исключением отрицательного контроля), хорошо перемешивают, накрывают и оставляют на инкубацию в течение одного часа при температуре плюс 37 °С. Далее проводят трехкратную отмывку лунок готовым моющим буфером, каждый раз используют объем буфера по 250 мкл, лунки планшета высушивают.

3.85. После инкубации повторяют процедуру промывки лунок моющим буфером еще три раза.

3.86. Добавляют по 50 мкл субстрата и хромогена в каждую лунку. Осторожно перемешивают вручную и инкубируют при температуре плюс 37 °С в течение 15 – 20 минут (не более 30 минут) в темноте.

3.87. Добавляют в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента и осторожно перемешивают вручную. В течение 30 минут после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм («бланк» или нулевое считывание по воздуху).

Обработка результатов измерения

3.88. Определение пороговой величины. Для каждой пробы отдельно вычисляют среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках F и G (отрицательный контроль). Для того, чтобы получить пороговую величину, к этому среднему значению добавляют 0,15, пример в таблице 8.

Таблица 8

Вычисление среднего значения оптической плотности

Пример:	Отрицательный контроль 1 = 0,08 Отрицательный контроль 2 = 0,10 Среднее значение = 0,09 Пороговая величина = 0,09 + 0,15 = 0,24
---------	--

Область достоверности (контроль качества анализа стафилококковых энтеротоксинов):

1) оптическая плотность, измеренная в лунках с положительным контролем, равна или больше 0,5;

2) средняя оптическая плотность, измеренная в лунках F и G (отрицательный контроль) равна или меньше 0,3;

3) если условия 1 и 2 не соблюдаются, результаты не подлежат интерпретации.

Интерпретация результатов

3.89. Результат интерпретируют как отрицательный, если величина оптической плотности ниже пороговой. Результат интерпретируют как положительный, если величина оптической плотности выше пороговой или равна ей.

Иммунохроматографический тест для выявления ботулотоксинов

3.90. ИХА – это иммунохимический анализ, в котором процессы жидкостной иммунохроматографии основаны на специфических (иммунных) взаимодействиях между аналитом и нанесенными на пористую тонкую мембрану специфичными рецепторными молекулами. Такой метод разрабатывают для выявления ботулотоксинов, как антигенов. Постановка и учет результатов ИХА

осуществляют согласно инструкции производителя тест-системы для определения ботулинических токсинов.

3.91. Укладка индикаторных иммунохроматографических элементов (далее – УИХЭ-1) для индикации различных возбудителей, а также ботулинического токсина типа А и типа В в смывах с поверхностей объектов окружающей среды. Данная укладка представляет собой иммунохроматографические индикаторные элементы и средства отбора пробы с поверхности, кисти, емкость с буфером анализа, стерильный тампон и схему анализа, уложенные в пылевлагозащищенный полимерный кейс. Расходные элементы укладки позволяют осуществить 10 анализов по пяти разновидностям патогенов. Имеется комплект пополнения, позволяющий быстро заменить израсходованные индикаторные элементы и буфер для проведения анализа и другие одноразовые аксессуары. Метод ИХА выполняют в течении 25 – 30 минут, индикаторные иммунохроматографические элементы укладки УИХЭ-1 обладают чувствительностью и специфичностью. Чувствительность выявления: ботулинический токсин типа А – 30 нг/мл, ботулинический токсин типа В – 20 нг/мл. Тип регистрации результатов анализа – визуальная оценка.

3.92. Вариант УИХЭ-1 с комплектацией мультианалитными иммунохроматографическими индикаторными устройствами (далее – МИУ), рассчитанными на выявление бактерий и токсинов. В МИУ ИХА тест-полоски расположены в полимерных разъемных оправках по 5 штук, при этом отобранную жидкую пробу вносят в отверстие для нанесения образца и равномерно распределяют по всем тест-полоскам. Верхняя крышка полимерной оправы МИУ имеет прямоугольные прорезы для визуальной регистрации результатов анализа и соответствующую маркировку. МИУ более компактная укладка с расширенной номенклатурой выявляемых антигенов бактерий, включая ботулотоксины А и В в едином цикле анализа. Оба варианта исполнения укладки УИХЭ-1 обладают высокой устойчивостью к воздействию механических и климатических факторов и используют для комплектования мобильных биолaborаторий. Полимерные кейсы укладки стойки к воздействию дезинфицирующих средств. Небольшие размеры и масса 5,5 кг и 2,0 кг соответственно, позволяют использовать их также как переносное средство специфической индикации. Чувствительность выявления: ботулинический токсин типа А – 30 нг/мл, ботулинический токсин типа В – 20 нг/мл. Тип регистрации результатов анализа – визуальная оценка.

3.93. Комплект «Экспресс-комплект-Био» (далее – ЭкБ) предназначен для отбора и подготовки проб содержимого пробоотборников биологических аэрозолей, культуральных сред после стадии биологического обогащения, смывов с поверхностей объектов окружающей среды. ЭкБ позволяет осуществлять индикацию методом ИХА различных антигенов некоторых вирусов, вегетативных и споровых форм бактерий, бактериальных и растительных токсинов, в частности ботулинического токсина типа А, ботулинического токсина типа В и др. Данный метод позволяет осуществлять регистрацию и фиксацию результатов ИХА, передачу результатов органам управления. Комплект рассчитан для отбора, подготовки и анализа 50 проб и эксплуатируют при температуре плюс 10 – 40 °С. Состоит из набора принадлежностей для подготовки отобранных проб к анализу, в который входит устройство для элюирования пробы с твердых сорбирующих

сред пробоботборников аэрозоля; набора мультианалитных иммунохроматографических тестов (далее – МИТ). Индикационные возможности комплекта обеспечены тремя видами МИТ: бактерии, вирусы и среда накопления, токсины. Комплект снабжен рефлектометрическим устройством, программное обеспечение которого позволяет автоматически распознавать положительные результаты анализа, задавать пороги интенсивности окрашивания зон МИТ, архивировать данные анализа и передавать их по электронной почте в вышестоящие органы для принятия решения. Компьютер, используемый в рефлектометрическом устройстве, имеет повышенную стойкость к механическим воздействиям и воздействию влаги. Комплект ЭкБ автономен, имеет собственный источник питания рефлектометра, может быть развернут как в лаборатории, так и в полевых условиях. Конструктивно комплект размещен в четырех ударопрочных водонепроницаемых полимерных кейсах и содержит все необходимые аксессуары для анализа содержимого пробоботборника аэрозоля при отборе в жидкость, на фильтры или плотные сорбирующие среды. Комплект снабжен также транспортной тарой, что позволяет перевозить его любыми видами воздушного и наземного транспорта. Тип регистрации результатов анализа – визуальная оценка.

Методика проведения мультиплексной ПЦР-РВ для выявления ботулотоксинов разных типов³⁸

3.94. Набор праймеров предназначен для быстрой детекции и идентификации штаммов *C. botulinum* и дифференциации продуцируемого типа токсина А, В, Е и F, а также, при необходимости, токсинов типа С, D, CD, DC методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (далее – ПЦР-РВ). Постановку и учет результатов ПЦР-РВ осуществляют согласно инструкции производителя тест-системы для определения генов, кодирующих ботулинические токсины. Алгоритм проведения исследований приведена в п.п. 3.95 – 3.98.

Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых проб

3.95. Экстракцию дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее – ДНК) из исследуемых проб, а также из бактериальных суспензий штаммов *C. botulinum*, в том числе контрольных, для анализа методом ПЦР в режиме реального времени проводят в соответствии с методическими документами³⁹, а также в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁴⁰. Для экстракции ДНК из штаммов микроорганизмов используют сертифицированные коммерческие наборы в соответствии с инструкцией по применению (для экстракции ДНК из

³⁸ Клинические рекомендации 2025-2026-2027.

³⁹ МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 22.12.2009.

⁴⁰ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

клинического материала используют коммерческие наборы, разрешенные к применению и зарегистрированные в установленном порядке). Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к набору.

Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

3.96. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 2 мкл. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени». Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

3.97. Для постановки ПЦР можно использовать готовые наборы, например, «2,5 × Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ».

3.97.1. Подготавливают реакционную смесь. Для тестирования даже одного исследуемого образца проводят постановку контролей. Кроме того, берут реагенты с запасом: для тестирования N образцов готовят реагенты для (N+1) реакций. В отдельной пробирке смешивают из расчета на каждый образец: 2.5 × Реакционной смеси 10 мкл; $MgCl_2$ 25 мМ 1,5 мкл; ddH₂O 5,28 мкл; праймеры в концентрации 20 пмоль/мкл по 0,415 мкл каждого; ДНК-зонды в концентрации 10 пмоль/мкл по 0,415 мкл каждого.

3.97.2. Вносят в каждую пробирку по 23 мкл подготовленной реакционной смеси. В пробирки с реакционной смесью добавляют по 2 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

3.98. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени». Программируют прибор (амплификатор с системой детекции в режиме реального времени) для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции данного прибора. При использовании указанных праймеров возможно применение программы амплификации: плюс 95 °С 5 минут – 1 цикл; плюс 94 °С 30 секунд и плюс 56 °С 90 секунд – 40 циклов. Устанавливают пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Запускают выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала. По окончании выполнения программы приступить к анализу и учету результатов.

Установка диагноза

3.99. Диагноз считают установленным: при обнаружении ботулинического токсина в исследуемом материале (без выделения культуры); при выделении из любого материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя ботулизма, с последующим определением биологическим методом типа токсина.

Выделенные культуры возбудителей ботулизма необходимо направлять для дальнейшей верификации, полногеномного секвенирования и депонирования в центр верификации (ГКПМ-ОБОЛЕНСК) и Референс-центр.

Методика проведения полногеномного секвенирования штаммов-возбудителей ботулизма

3.100. Проведение полногеномного секвенирования штаммов-возбудителей ботулизма *C. botulinum* используют как инструмент для установления эпидемически значимых генетических линий или клонов бактериальных патогенов, циркулирующих в том или ином регионе. Его применяют также для установления источника возбудителя вспышки пищевой инфекции путем сравнения идентичности генотипа/генома штаммов патогена, выделенных от больных и непосредственно из продуктов питания, после употребления которых заболели люди. Генотипирование особенно актуально для анализа вспышек ботулизма, поскольку культуры *C. botulinum* отличаются большим фено- и генотипическим разнообразием. Это разнообразие обусловлено присутствием в их геномах детерминант разных типов и подтипов нейротоксина, в том числе гибридных, а также присутствием мобильных генетических элементов (например, плазмид, профагов, IS-элементов). Огромное количество информации о *C. botulinum* можно получить при секвенировании нуклеотидных последовательностей всего генома возбудителя. Биоинформационное прочтение нуклеотидной последовательности генома *C. botulinum* позволяет установить генетические особенности штамма, построить филогенетические деревья, выявив сходства/различия с геномами штаммов размещенных в GenBank⁴¹, наличие у него плазмид, профагов, детерминант антибиотикорезистентности, определить тип продуцируемого штаммом нейротоксина. Ожидается, что с расширением возможностей и снижением стоимости полногеномного секвенирования этот метод все больше будет заменять традиционные методы генетического типирования, используемые сейчас для характеристики бактерий. Одновременно полногеномное секвенирование позволяет нам лучше понять природу токсинпродуцирующих клостридий, их генетическое и биологическое разнообразие, генетическую пластичность.

3.101. Для выделения тотальной ДНК возбудителя ботулизма могут быть использованы наборы различных фирм производителей. Для полногеномного секвенирования применяют секвенаторы нового поколения, такие как платформы на основе синтеза или наношариков. Подготовку библиотек и запуск секвенирования осуществляют в соответствии с инструкциями производителя оборудования.

⁴¹ Примечание: GenBank, NCBI – база данных, содержащая аннотированные последовательности ДНК и РНК, а также последовательности закодированных в них белков www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ (в свободном доступе). Примечание: допускается использовать базы данных с аналогичными или лучшими характеристиками.

Полногеномное высокопроизводительное секвенирование технологией синтеза (платформа Illumina MiSeq⁴²)

3.102. Приготовление ДНК-библиотек проводят с использованием набора для подготовки библиотек ДНК, включающего этапы: тагментация, амплификация тагментированной ДНК и очистка библиотек.

3.103. Для тагментации концентрацию ДНК нормализуют до 0,2 нг/мкл. К 5 мкл нормализованной ДНК добавляют 10 мкл тагментирующего буфера и 5 мкл амплифицирующей смеси. Пробирки инкубируют при температуре плюс 55 °С 5 минут, охлаждают до температуры плюс 10 °С, добавляют 5 мкл нейтрализующего буфера, центрифугируют (1 минуту при 1700 об/мин) и инкубируют 5 минут при комнатной температуре.

3.104. К тагментированной ДНК добавляют индексы 1 и 2 (в вертикальные ряды – индекс 1, в горизонтальные – индекс 2), затем 15 мкл ПЦР-смеси. После центрифугирования проводят амплификацию в термоциклере: при температуре плюс 72 °С (3 минуты), плюс 95 °С (30 секунд), 12 циклов (плюс 95 °С – 10 секунд, плюс 55 °С – 30 секунд, плюс 72 °С – 30 секунд), финальная элонгация при температуре плюс 72 °С (5 минут).

3.105. Очистку проводят на магнитных частицах: добавляют 30 мкл частиц к образцам, инкубируют, промывают 80 % этанолом, высушивают и элюируют ДНК в 52,5 мкл буфера. Концентрацию библиотек измеряют флуориметром.

3.106. Для секвенирования картридж размораживают при комнатной температуре. Библиотеки нормализуют до 4 нмоль/10 мкл, объединяют и денатурируют 0,2 N NaOH.

3.107. Смесь библиотек (5 мкл) обрабатывают 0,2 N NaOH (5 мкл), инкубируют 5 минут, нейтрализуют и разбавляют до 20 пмоль. 600 мкл раствора вносят в картридж.

3.108. Настройка секвенатора включает создание панели образцов, выбор параметров запуска (формат данных, количество циклов) и следование инструкциям на экране.

Полногеномное секвенирование технологией синтеза (платформа Genolab M⁴³)

3.109. Подготовка библиотек проводят с использованием набора для подготовки библиотек ДНК, включая этапы: фрагментация, лигирование адаптеров, очистка, индексная ПЦР.

3.110. Для фрагментации ДНК вносят 10 мкл ДНК с концентрацией 20 нг/мкл в стрипы или пробирки объемом 0,2 мл. Готовят мастер-микс для фрагментации: буфер (3 в 1) – 13,4 мкл, 3-фермент – 1,6 мкл и ДНК-нуклеаза –

⁴² Примечание: для проведения полногеномного высокопроизводительного секвенирования технологией синтеза допускается использовать оборудование с аналогичными или лучшими характеристиками.

⁴³ Примечание: для проведения полногеномного высокопроизводительного секвенирования технологией синтеза допускается использовать оборудование с аналогичными или лучшими характеристиками.

1 мкл. Мастер-микс добавляют в образцы ДНК и помещают в амплификатор после выхода прибора в рабочее состояние после первого этапа. Программа для фрагментации: температура плюс $+4\text{ }^{\circ}\text{C} - \infty$, плюс $65\text{ }^{\circ}\text{C} - 25$ минут, плюс $75\text{ }^{\circ}\text{C} - 10$ минут и охлаждение образцов — плюс $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.111. Для лигирования адаптеров готовят мастер-микс на необходимое количество реакций: лигазный буфер — 20,5 мкл, адаптеры — 3,5 мкл, лигаза — 1 мкл. Перемешивают, сбрасывают капли с помощью кратковременного центрифугирования. После завершения программы фрагментации вносят по 25 мкл получившегося мастер-микса к образцам. Помещают в амплификатор с установленной программой для лигирования: при температуре плюс $4\text{ }^{\circ}\text{C} - \infty$, плюс $22\text{ }^{\circ}\text{C} - 30$ минут, плюс $4\text{ }^{\circ}\text{C} - \infty$. После установки пробирок в амплификатор пропускают первый шаг.

3.112. После проведения лигирования проводят очистку на магнитных частицах. Для очистки к каждому образцу добавляют 45 мкл магнитных частиц и перемешивают на вортексе до гомогенного состояния. Инкубируют 5 минут при комнатной температуре. Далее помещают образцы на магнитный штатив, инкубируют 3 – 5 минут до прозрачного раствора. После этого удаляют супернатант. Дважды промывают 200 мкл 80 % этанолом (свежеприготовленным). Удаляют спирт. Далее высушивают образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут до полного испарения остатков спирта. Добавляют 24 мкл деионизированной, свободной от нуклеаз воды к магнитным частицам. Интенсивно перемешивают пробирки на вортексе, сбрасывают капли с помощью кратковременного центрифугирования. Помещают образцы на магнитный штатив, инкубируют в течение 2 – 3 минут до прозрачного раствора. Переносят 22 мкл элюата в новые пробирки или стрипы, не захватывая магнитные частицы.

3.113. На этапе проведения индексной ПЦР к каждому образцу добавляют по 2 мкл индивидуальных праймерных миксов. Далее готовят мастер-микс на необходимое количество реакций: ПЦР буфер — 25 мкл, ПЦР фермент 1 — 0,5 мкл, ПЦР фермент 2 — 0,75 мкл. Перемешивают мастер-микс, осаждают. Вносят по 26,25 мкл к каждому образцу. Помещают пробирки в амплификатор. Запускают программу для индексной ПЦР: при температуре плюс $95\text{ }^{\circ}\text{C} - 2$ минуты, плюс $95\text{ }^{\circ}\text{C} - 15$ секунд, плюс $56\text{ }^{\circ}\text{C} - 30$ секунд, плюс $72\text{ }^{\circ}\text{C} - 17$ секунд, плюс $72\text{ }^{\circ}\text{C} - 2$ минуты, плюс $4\text{ }^{\circ}\text{C} - \infty$.

3.114. После ПЦР-реакции проводят очистку на магнитных частицах, для этого добавляют 50 мкл магнитных частиц к каждому образцу, перемешивают на вортексе до гомогенного состояния. Инкубируют 5 минут при комнатной температуре. Далее помещают образцы на магнитный штатив, инкубируют 3 – 5 минут до просветления раствора, удаляют супернатант. Дважды промывают 200 мкл 80 % этанолом (свежеприготовленным), этанол удаляют. Далее высушивают образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут до полного испарения остатков спирта. Добавляют 22 мкл ТЕ буфера к осадку частиц. Интенсивно перемешивают пробирки на вортексе, сбрасывают капли с помощью кратковременного центрифугирования. Помещают образцы на магнитный штатив, инкубируют в течение 2 – 3 минут до просветления раствора. Переносят 20 мкл элюата в новые пробирки или стрипы,

не захватывая магнитные частицы. Концентрацию очищенных библиотек проверяют на флуориметре.

3.115. Получившийся ПЦР-продукт нормализовывают до 4 нмоль в 20 мкл, разбавляя водой лабораторного качества. Нормализованные библиотеки объединяют по 5 мкл каждого образца в пробирке на 1,5 мл – 2 мл. Картридж для секвенирования хранят при температуре минус 15 – 25 °С. Не позднее, чем за 2 часа до запуска, картридж помещают в водяную баню комнатной температуры. Заранее (минимум за 30 мин до запуска) достают загрузочную проточную ячейку, которую хранят при температуре плюс 2 – 8 °С.

3.116. Полученный пул библиотек денатурируют 0,2 N NaOH. В отдельную микроцентрифужную пробирку вносят 800 мкл воды и 200 мкл 1 N NaOH. В результате получают 1 мл 0,2 N NaOH. Раствор перемешивают, перевернув несколько раз. Полученный раствор используют в течение 12 часов. В микроцентрифужной пробирке смешивают 5 мкл 4 нмоль объединенных библиотек и 5 мкл 0,2 н NaOH, полученную смесь перемешивают на вортексе, после чего центрифугируют при 1700 об/мин в течение 1 минуты и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин. Для остановки реакции денатурации добавляют 5 мкл нейтрализующего реагента. Далее вносят 985 мкл гибридизующего реагента, 20 пмоль смесь библиотек готова. Для получения загрузочной концентрации (2,5 пмоль) в пробирку на 2 мл вносят 187,5 мкл смеси библиотек (концентрация 20 пмоль) и 1312,5 мкл гибридизующего реагента. Полученную пробирку с 2,5 пмоль библиотекой помещают в загрузочный порт для образца в картридже.

3.117. Для подготовки секвенатора к запуску включают прибор и запускают сопряженный с прибором системный блок. Перед тем, как начать процесс секвенирования, осуществляют промывку прибора. Входят в программу, выбирают вкладку «Регулярная промывка». Для промывки используют промывочную ячейку и три промывочные картриджи, которые заполняют растворами: первый – Твин 20 0,05 % (в 999,5 мл деионизованной воды растворяют 500 мкл Твин 20); второй – 0,1 N NaOH (в 1 литре деионизованной воды растворяют 4 г гидроксида натрия); третий – деионизованная вода. Суммарное время промывки – 50 минут. На сенсорной панели прибора проверяют показатели температуры охлаждаемого контейнера для реагентов – не более плюс 5 °С. После промывки прибора в программе выбирают вкладку «Секвенирование». Следующим этапом подгружают файл со всей информацией о запуске в формате .csv. Вносят необходимую информацию в следующие ячейки: В2 – название эксперимента, А7 – количество циклов для первой нити ДНК, А8 – количество циклов для второй нити ДНК, В14 – необходимость демультиплексирования, начиная с ячейки А18 – название образцов, с ячейки F18 – последовательность индекса 1, с ячейки Н18 – последовательность индекса 2. Перед загрузкой сканируют штрих-код ячейки, который отображается на сенсорной панели. Перед загрузкой в прибор ячейку предварительно протирают в одном направлении безворсовой салфеткой, пропитанной 96 % этанолом. В отсек для реагентов загружают картридж (блок А или блок В). Картридж предварительно встряхивают, чтобы перемешать реагенты, и удалить крышку с пробирки исследуемого образца. Сканируют штрих-код картриджа. После

нажатия кнопки «начало» запускают процесс секвенирования. На сенсорной панели прибора отображается время секвенирования, количество пройденных циклов, загрузка ячейки кластерами, шкала с качеством секвенируемых данных Q30. По окончании процесса секвенирования прибор промывают.

Полногеномное секвенирование технологией наношариков

3.118. Подготовка библиотек включает фрагментацию ДНК ультразвуком (100 – 700 п.н.), отбор фрагментов, восстановление концов, лигирование адаптеров, амплификацию, циркуляризацию и формирование наношариков.

3.119. Для приготовления ДНК-библиотек исходную ДНК фрагментируют. Размер фрагментов должен быть в диапазоне 100 – 700 пар оснований, с пиком в 250 – 300 пар оснований. ДНК фрагментируют с помощью ультразвука в ультразвуковой бане в течение 7 минут с рабочим циклом: 15 секунд работы и 1 минута отдыха. В работу берут 1000 нг ДНК в 100 мкл ТЕ-буфера. Контроль качества проведенной фрагментации осуществляют с помощью электрофореза в агарозном геле.

3.120. На следующем этапе отбирают фрагменты нужной длины. Отбор фрагмента осуществляют с помощью магнитных частиц: 50 мкл ДНК осаждают на магнитных частицах (30 мкл), после чего супернатант переносят в чистые пробирки, а магнитные частицы сбрасывают. К полученному супернатанту вносят 10 мкл магнитных частиц, супернатант удаляют, дважды промывают образец 200 мкл 80 % этанолом (свежеприготовленным), далее удаляют оставшийся спирт. Высушивают в магнитном штативе в течение 10 минут, затем извлекают пробирки из магнитного штатива, элюируют 42 мкл ТЕ буфера. После отбора фрагмента нужной длины производят количественную оценку с помощью флуориметрии.

3.121. После получения фрагментов нужной длины осуществляют восстановление концов молекул ДНК после фрагментации и наращивание добавление липких 3'-А концов ДНК. На первом этапе образцы после отбора фрагмента нужной длины нормализуют, в последующую работу берут 100 нг ДНК в 40 мкл ТЕ буфера. Затем готовят смесь реактивов для восстановления концов из расчета 7,1 мкл буфера и 2,9 мкл фермента на один образец. По 10 мкл полученной смеси вносят в каждый образец, после чего тщательно перемешивают и ставят в термоциклер с предварительно нагретой крышкой и установленной программой: плюс 37 °С – 15 минут, плюс 65 °С – 30 минут, охлаждение – плюс 4 °С.

3.122. На следующем этапе проводят лигирование адаптерных последовательностей. Для проведения реакции к каждому образцу добавляют 5 мкл уникальных для каждого образца адаптеров и заранее приготовленную смесь ДНК-лигазы и буфера для лигирования. Полученную смесь инкубируют в термоциклере при температуре плюс 23 °С в течение 30 минут, затем охлаждают до плюс 4 °С. После инкубирования образцы коротко осаждают на микроцентрифуге и вносят 20 мкл ТЕ-буфера в каждый образец, доводя конечный объем до 100 мкл.

3.123. Продукт лигирования очищают на магнитных частицах, добавляя 50 мкл магнитных частиц к образцам, интенсивно перемешивают их и инкубируют в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего помещают на магнитный штатив до просветления, удаляют супернатант и дважды промывают 200 мкл 80 % этанолом (свежеприготовленным). Этанол отбирают, образцы коротко центрифугируют и снова помещают на магнитный штатив с целью удалить оставшийся этанол. После чего образцы высушивают на магнитном штативе, снимают с магнитного штатива и вносят 21 мкл ТЕ-буфера в каждый образец, инкубируют 5 минут при комнатной температуре, коротко центрифугируют и помещают на магнитный штатив до полного просветления. В чистые пробирки отбирают 19 мкл супернатанта, который используют для последующей амплификации.

3.124. Для проведения амплификации готовят мастер-микс, из расчета 25 мкл смеси реактивов и 6 мкл смеси праймеров. К образцам добавляют 31 мкл полученного мастер-микса, тщательно перемешивают, осаждают и помещают их в термоциклер с нагретой крышкой и установленной программой: при температуре плюс 95 °С – 3 минуты, далее 7 циклов: плюс 98 °С – 20 с, плюс 60 °С – 15 секунд, плюс 72 °С – 30 секунд, после чего заключительная элонгация плюс 72 °С – 10 минут и охлаждение до плюс 4 °С.

3.125. Продукт амплификации очищают на магнитных частицах, добавляя 50 мкл магнитных частиц к образцам, интенсивно перемешивают их и инкубируют в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего помещают на магнитный штатив до просветления, удаляют супернатант и дважды промывают 200 мкл 80 % этанолом (свежеприготовленным). Этанол отбирают, образцы коротко центрифугируют и снова помещают на магнитный штатив с целью удалить оставшийся этанол. После чего образцы высушивают на магнитном штативе, снимают с штатива и вносят 32 мкл ТЕ-буфера в каждый образец, инкубируют 5 минут при комнатной температуре, коротко центрифугируют и помещают на магнитный штатив до полного просветления. В чистые пробирки отбирают 30 мкл супернатанта, который используют для циркуляризации. После очистки измеряют концентрацию нуклеиновой кислоты. Далее образцы объединяют в зависимости от их концентрации, размера генома и дорожки на проточной ячейке.

3.126. Для циркуляризации используют 1 пкмоль объединенных библиотек, объем доводят до 48 мкл ТЕ-буфером. Из объединенных библиотек получают кольцевую ДНК (процесс включает денатурацию при температуре плюс 95 °С, циркуляризацию одноцепочечной ДНК, ферментативное разрушение оставшейся двуцепочечной ДНК и очистку на магнитных частицах). Концентрацию полученных кольцевых фрагментов ДНК учитывают и рассчитывают необходимое количество для получения наношариков.

3.127. Для получения наношариков в реакцию берут 60 пмоль кольцевой ДНК-библиотеки для каждого наношарика. Объем доводят до 20 мкл с помощью буферного раствора, к полученной смеси добавляют 20 мкл буфера для создания наношариков, аккуратно перемешивают и ставят в термоциклер с установленной программой: при температуре плюс 95 °С – 1 минуту, плюс 65 °С – 1 минуту, плюс 40 °С – 1 минуту, после чего охлаждают до плюс 4 °С. Полученную смесь

осаждают и помещают на лед. После чего к ней добавляют смесь ферментов для формирования наношариков. Полученную смесь аккуратно перемешивают, осаждают и инкубируют при температуре плюс 35 °С 35 минут в термоциклере с заранее нагретой до плюс 35 °С крышкой. После реакции вносят 20 мкл буфера для остановки реакции и осторожно перемешивают пипеткой 5 – 8 раз. Эту и последующие манипуляции необходимо осуществлять наконечниками с широким отверстием с целью предотвращения механического повреждения наношариков. После получения наношариков проводят их квантификацию, концентрация должна превышать 8 нг/мкл.

3.128. В связи с малыми размерами геномов осуществляют независимую загрузку образцов на каждую дорожку проточной ячейки. Для этого используют специализированный загрузчик. Готовят загрузочную смесь: 16 мкл буфера для загрузки наношариков и 0,5 мкл смеси ферментов для создания наношариков на каждый образец, 25 мкл наношариков. 30 мкл загрузочной смеси наносят на ячейку с помощью загрузчика и инкубируют проточную ячейку 30 минут при комнатной температуре. Картридж с реагентами для секвенирования заранее помещают в водяную баню при комнатной температуре для оттаивания. Затем его необходимо перемешать. В фольге ячеек № 1 и № 2 картриджа проделывают отверстия. Готовят смесь дезоксинуклеотидов и смесь ферментов для секвенирования и вносят в соответствующие ячейки. После чего отверстия заклеивают пленкой и интенсивно перемешивают картридж. Пленку удаляют после перемешивания. Затем 500 мкл смеси ферментов для множественной амплификации смещения вносят в реагент для множественной амплификации смещения, проделывают отверстие в фольге ячейки картриджа и вносят всю смесь в соответствующее отверстие. Ячейку и картридж устанавливают в прибор, считывают их баркоды, указывают тип загрузки и длину прочтений.

IV. ПРОВЕДЕНИЕ САНИТАРНО-ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ (ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ) МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ БОТУЛИЗМЕ

4.1. При выявлении случаев, подозрительных на заболевание ботулизмом территориальными органами, осуществляющими федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор) с привлечением учреждений, обеспечивающих их деятельность незамедлительно организуется проведение эпидемиологического расследования с целью установления причинно-следственной связи формирования очага ботулизма (с единичным или с множественными случаями заболеваний) и комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на недопущение распространения заболевания⁴⁴.

⁴⁴ Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера» (зарегистрировано Минюстом России 24.03.2016, регистрационный № 41525), с изменениями, внесенными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 20.04.2016 № 48 (зарегистрировано Минюстом России 11.05.2016, регистрационный № 42072) (далее – постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11).

4.2. Организация и проведение эпидемиологического расследования и санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁴⁵ и методическими документами⁴⁶.

4.3. Эпидемиологический анамнез собирается медицинским работником⁴⁷. При подозрении на ботулизм уточняется время, объем и перечень употребления в пищу подозрительных пищевых продуктов: мясные, рыбные, овощные и грибные консервы домашнего или промышленного производства, вяленая не потрошенная рыба, колбаса домашнего приготовления (особенно при хранении народным способом «в жиру»), другие пищевые продукты, находившиеся или хранимые в герметичной упаковке; уточняются также сведения о лицах, употреблявших продукты вместе с больным.

4.4. При подозрении на ботулизм медицинские работники, выявившие больного, сообщают о подозрительном случае в территориальный орган, осуществляющий федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор) по месту выявления больного (независимо от места его постоянного пребывания)⁴⁸.

4.5. В рамках эпидемиологического расследования:

- проводят сбор анамнеза у пострадавших (или близких к ним лиц) с целью установления вероятного продукта с наличием токсина и определения круга лиц, подвергшихся риску инфицирования. При опросе больных обращают внимание на следующее: чем питались пострадавшие в течение пяти суток до начала заболевания; имеются ли аналогичные заболевания среди членов семьи пострадавших или их знакомых; время, прошедшее с момента употребления подозреваемого продукта до появления признаков заболевания. Путем сопоставления полученных по результатам опроса данных устанавливают продукты, общие для пострадавших, общую клиническую картину заболевания, инкубационный период заболевания и границы очага;

- определяют круг лиц, подвергшихся риску инфицирования, проводят их опрос и организуют отбор материала для лабораторного исследования (материал отбирают медицинские работники (немедленно, в день обращения больного)⁴⁹ и направляют в лабораторию, готовую к проведению исследований на ботулизм в соответствии с главой III;

- организуют осмотр очага: мест, где пострадавшие употребляли и приобретали вероятный инфицированный продукт, а также мест производства, хранения и транспортировки данного продукта;

- изучают, уточняют и оценивают условия, при которых возможно образование и накопление ботулотоксина в продуктах питания, с которыми

⁴⁵ Глава XXIV СанПиН 3.3686-21.

⁴⁶ МУ 3.1.3114/1-13 «Организация работы в очагах инфекционных и паразитарных болезней», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 22.10.2013 (далее – МУ 3.1.3114/1-13).

⁴⁷ Пункт 31 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁸ Пункты 24, 25 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁹ Пункт 33 СанПиН 3.3686-21.

связывают заболевание пострадавшие на всех этапах его изготовления, хранения, транспортировки и реализации;

- истребуют и изучают документы, подтверждающие прослеживаемость пищевой продукции, технологические карты, технические условия и другие материалы, связанные с производством, хранением и реализацией продукции, подозрительной на содержания ботулотоксина с целью обнаружения рисков образования ботулотоксина в процессе изготовления (попадание загрязненного (почвой, биологическими удобрениями) сырья, возможности перемешивания («перекрест») с партиями другого сырья, соблюдение требований по обеззараживанию и стерилизации (при первичной и последующей обработке сырья); создание анаэробных условий в процессе изготовления продукта (например, соблюдение технологических условий при автоклавировании с учетом емкости посуды, выдерживания и контроль требуемых температур);

- производят отбор проб продуктов, подозрительных на содержание ботулотоксина, смывов из тары, емкостей, оборудования и инвентаря для направления в лабораторию территориальных подразделений центров гигиены и эпидемиологии;

- проводят опрос лиц, имеющих отношение к производству (изготовлению), хранению, транспортировке и реализации вероятно инфицированной продукции;

- уточняют места и объемы производимой продукции, места поставок и реализации вероятно инфицированной продукции, производят информирование соответствующих органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор) в субъектах Российской Федерации или их филиалов (по месту производства или поставок вероятно инфицированной продукции);

- выявляют нарушения законодательства Российской Федерации⁵⁰, которые могли создать условия и предпосылки для накопления ботулотоксина в вероятно инфицированных продуктах.

4.6. По результатам осмотра очага и опроса пострадавших определяют вероятные границы очага (оценивают риск распространения заболевания с учетом объемов продукции и мест ее реализации, числа лиц, подвергшихся риску инфицирования) и формируют предварительный эпидемиологический диагноз, который уточняют при выявлении новых фактов или результатов лабораторных исследований⁵¹.

4.7. При наличии признаков умышленного применения ботулотоксина, выявленных в ходе эпидемиологического расследования, информацию незамедлительно передают вышестоящему руководителю и заинтересованным ведомствам в соответствии со схемой оперативного информирования.

4.8. Комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на локализацию и ликвидацию очага ботулизма, организуют одновременно с началом эпидемиологического расследования на

⁵⁰ Статья 15 Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (далее – Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ).

⁵¹ МУ 3.1.3114/1-13.

основании предварительного эпидемиологического диагноза и уточняют с учетом появления новых фактов и результатов лабораторных исследований.

Комплекс санитарно-противоэпидемических мероприятий (профилактических) мероприятий организуют с привлечением специалистов заинтересованных федеральных органов исполнительной власти (например, здравоохранения, сельского хозяйства, промышленности, силовых ведомств, органов государственной власти субъектов Российской Федерации и муниципального управления).

При необходимости для координации межведомственной работы организуют муниципальные, региональные или федеральные оперативные штабы (комиссии)⁵² (при летальных исходах заболеваний или при крупных очагах от 5 случаев и более⁵³, когда произошедшее классифицируют как чрезвычайная ситуация санитарно-эпидемиологического характера).

С целью обеспечения проведения всех необходимых санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий рекомендуется составлять план санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий ликвидации очага ботулизма (далее – План), проект которого готовят территориальные органы, осуществляющие федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), а утверждение осуществляют ответственные лица органов государственной власти субъекта Российской Федерации.

4.9. Планом предусматриваются следующие мероприятия:

- формирование межведомственной бригады для выезда в очаг (к месту происшествия и связанных с ним локаций);
- проведение эпидемиологического расследования;
- организация активного выявления лиц, подвергшихся риску заражения (подворные или поквартирные обходы, обзвон, информирование и запрос о самочувствии через мессенджеры, использование средств массовой информации с участием медицинских сотрудников и сотрудников территориальных подразделений министерства внутренних дел Российской Федерации (МВД) или (при подозрении на умышленный характер ситуации) федеральной службы безопасности Российской Федерации (ФСБ);
- отбор материала от больных (подозрительных на заболевание);
- отбор материала из объектов окружающей среды и пищевых продуктов.

При этом перечень и объемы материала как от больных, так из окружающей среды определяет должностное лицо, отвечающее за проведение эпидемиологического расследования⁵⁴;

- в отношении пострадавших и лиц, подвергшихся риску инфицирования при наличии симптомов, не исключая ботулизм, проводится госпитализация, при отсутствии симптомов заболевания организуется обязательное направление для медицинского освидетельствования к врачу-инфекционисту и

⁵² Пункт 7 СанПиН 3.3686-21.

⁵³ Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11.

⁵⁴ Пункт 38 СанПиН 3.3686-21.

устанавливается медицинское наблюдение сроком до 5 дней с момента употребления вероятно инфицированного продукта;

- в очагах по месту приема, изготовления, хранения и реализации вероятно инфицированной продукции организуются дезинфекционные мероприятия с привлечением организаций дезинфекционного профиля, имеющих соответствующую лицензию на оказание услуг по дезинфекции⁵⁵;

- принимаются меры по обеспечению готовности приема пострадавших в медицинские организации, наличию необходимых медикаментов и расходных материалов;

- принимаются меры по запрещению употребления в пищу, приостановке реализации вероятно инфицированной продукции, при наличии подтверждения факта инфицирования продукции – меры по ее уничтожению;

- принимаются меры по устранению нарушений в технологии производства, хранения или реализации продукции, создавшие риски накопления ботулотоксина;

- при выявлении фактов нарушения требований санитарного законодательства при производстве, хранении, транспортировке и реализации⁵⁶ вероятно инфицированной продукции принимаются меры административного воздействия в соответствии с Кодексом об административных правонарушениях в Российской Федерации⁵⁷;

- среди населения организуется просветительская работа по снижению риска инфицирования и распространения случаев ботулизма;

- организуется комплекс мер, направленных на профилактику новых случаев инфицирования ботулизмом (в том числе, пресечение несанкционированной торговли пищевыми продуктами, усиление санитарно-эпидемиологического надзора в отношении отдельных видов продуктов, обучение медицинского персонала и отдельных категорий граждан).

4.10. Эпидемиологическое расследование с учетом проведения комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий завершают составлением акта эпидемиологического расследования очага инфекционной (паразитарной) болезни с установлением причинно-следственной связи установленной формы⁵⁸.

⁵⁵ Положение о лицензировании деятельности по оказанию услуг по дезинфекции, дезинсекции и дератизации в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 20.03.2024 № 337.

⁵⁶ Статья 15 Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ.

⁵⁷ Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях от 30.12.2001 № 195-ФЗ.

⁵⁸ Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 21.10.2010 № 133 «Об оптимизации противоэпидемической работы и утверждении формы акта эпидемиологического расследования очага инфекционной (паразитарной) болезни с установлением причинно-следственной связи» (зарегистрировано Минюстом России 25.11.2010, регистрационный № 19040).

V. ПРОФИЛАКТИКА БОТУЛИЗМА

Общие подходы к профилактике ботулизма

5.1. Основные мероприятия, направленные на профилактику ботулизма в условиях промышленного и бытового производства потенциально-опасной пищевой продукции включают в себя систематический контроль со стороны изготовителя критических точек технологического процесса, основанный на принципах Системы анализа опасных факторов и критических точек контроля (англ. НАССР – Hazard Analysis and Critical Control Points, далее – ХАССП)⁵⁹, соблюдение юридическими лицами, индивидуальными предпринимателями и гражданами обязательных требований санитарно-гигиенических норм и правил, технологических рецептов при изготовлении, хранении и реализации продовольственного сырья и пищевой продукции⁶⁰, проведение санитарно-просветительной работы среди населения⁶¹.

5.2. Профилактика ботулизма при изготовлении длительно хранящихся пищевых продуктов должна включать в себя комплекс мероприятий, которые можно разделить на три группы: защита продукта от попадания в него возбудителя; эффективная термическая обработка, обеспечивающая гибель вегетативных форм, спор возбудителя, инактивацию токсина возбудителя; предупреждение возможности развития спор, размножения вегетативных форм и образования токсина возбудителя в готовом продукте.

5.3. Защита пищевого продукта от попадания в него возбудителя включает, в том числе, соблюдение технологии и санитарно-гигиенического режима производственного процесса при обработке сырья, тщательную очистку и промывку исходного материала проточной водой от загрязнений землей и пылью (например, грибы, овощи, фрукты), быстрое и тщательное удаление внутренностей (например, кишечник, желчный пузырь, жабры) при послеубойной разделке туш животных, эвентрации рыбы.

5.4. Температурная обработка продукта, обеспечивающая гибель вегетативных форм, инактивацию токсина и гибель спор включает охлаждение продукта сразу после очистки, промывки, подготовки, если он не подлежит моментальной тепловой обработке, а также его тепловую обработку путем стерилизации в автоклавах в условиях повышенного давления и температуры с учетом формулы стерилизации, разработанной для каждого вида продукции и объема продукта. Тепловая обработка в домашних условиях при температуре

⁵⁹ Статья 10 технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011), утвержденного решением Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 № 880, с изменениями, внесенными решениями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11.06.2013 № 129, от 10.06.2014 № 91, решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 24.12.2019 № 236, решениями Совета Евразийской экономической комиссии от 08.08.2019 № 115, от 14.07.2021 № 61, от 25.11.2022 № 173, от 23.06.2023 № 70, от 22.04.2024 № 35 (далее – ТР ТС 021/2011).

⁶⁰ Статьи 10–19 ТР ТС 021/2011.

⁶¹ Статья 2 Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

плюс 100 °С не является «стерилизацией», поскольку данный способ убивает только вегетативные формы *C. botulinum*.

5.5. Меры по предупреждению возможности развития спор, размножения возбудителя и образования токсина в готовом продукте включают повторную тепловую обработку продукта перед его употреблением.

5.6. Профилактика раневого ботулизма заключается в своевременной первичной обработки ран. Во избежание побочных эффектов ботулотоксина, при использовании его в медицинских целях, необходимо соблюдение инструкции по применению лекарственного препарата.

Рекомендации при изготовлении консервированных продуктов питания в условиях промышленного производства

5.7. Технологические процессы на предприятиях пищевой промышленности организуют таким образом, чтобы при каждой операции исключалась возможность прорастания спор возбудителя или выхода вегетативных клеток из покоящегося состояния.

5.8. Возможно применение комбинированной обработки температурой и добавлением консервирующих агентов (соли, сахара, кислот) в целях предохранения их от порчи и возможного развития в них культуры ботулизма. Концентрацию консервантов устанавливают в зависимости от особенностей рецептуры и технологии изготовления продуктов.

5.9. Вид тары и ее состав может влиять на жизнеспособность вегетативных форм, спор и продуцирование токсина. Предпочтение отдают нелакированным жестяным банкам относительно стеклянных и лакированных жестяных. Продукты, упакованные в пленки, хранят только при низких температурах и не дольше установленных сроков.

5.10. В целях обеспечения безопасности пищевой продукции предприятие разрабатывает программу производственного контроля и выполняет комплекс санитарно-гигиенических мероприятий, включающий дезинфекцию, дезинсекцию и дератизацию⁶².

5.11. При поступлении на предприятия пищевой промышленности проводится обработка мяса теплой водой при температуре плюс 35 – 40 °С фонтанирующими щетками, изготовленными из не адсорбирующего материала.

5.12. Доски для разделки промываются от остатков мяса методом прошпаривания или автоклавирования.

5.13. В обвалочно-жиловочном помещении поддерживается температура плюс 10 – 12 °С⁶³ и относительная влажность воздуха 75 – 80 %. Изготовление

⁶² Глава III СанПиН 3.3686-21; пункт 3 статьи 10 ТР ТС 021/2011.

⁶³ Пункт 49 статьи VII Технического регламента Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» (ТР ТС 034/2013), утвержденного решением Комиссии Таможенного союза от 09.10.2013 № 68, с изменениями, внесенными решениями Совета Евразийской экономической комиссии от 23.06.2023 №70, 27.09.2023 № 98; решениями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 27.02.2024 №13; 05.03.2024 №15 (далее – ТР ТС 034/2013).

мясопродуктов, получаемых путем посола, проводится при температуре плюс 2 – 4 °С.

5.14. Рекомендуемая концентрация рассола для консервов и полуконсервов в герметически укупоренной таре при длительном хранении составляет не менее 6 % NaCl (в водной фазе), термическая обработка эквивалентна 0,6 минут при температуре плюс 121,1 °С, т.е. $F_0 = 0,6$. Аналогичные мясопродукты, прогретые до температуры плюс 80 °С в центре продукта, отнесенные к категории полуконсервов, хранят при температуре от 0 до плюс 3 °С.

5.15. При производстве рыбной продукции, разгрузку речной или морской рыбы в порту или на рыболовецком судне проводят с использованием специальных разборных помостов или решеток с целью соблюдения мер, предохраняющих рыбу от загрязнения или механических повреждений. Приспособления по окончании работы тщательно очистят, промывают горячей водой и дезинфицируют. При массовых поступлениях рыбы разгрузку допускается производить на очищенный, промытый и продезинфицированный пол. Для дальнейшей транспортировки рекомендовано использовать чистый, не загрязненный опилками или почвой пищевой лед. Рыба, поступающая в производство, до обработки промывается в проточной воде из шланга или в моечных машинах. Разделка рыбы и удаление внутренностей проводится согласно требованиям, предусмотренным соответствующими технологическими инструкциями и стандартами на производстве⁶⁴.

5.16. Посол для приготовления из рыбы соленых, копченых и вяленых продуктов, осуществляется тремя способами: сухим, мокрым и смешанным. Для предотвращения возможности порчи рыбы во время посола и образования в ней токсина ботулизма рекомендован смешанный посол, при котором рыбу, обваленную в соли, загружают в емкость с предварительно налитым искусственным тузлуком. Проникновение соли в ткани рыбы данным способом начинается немедленно. В зависимости от температурных условий имеет место теплый, охлажденный и холодный посол. Наиболее распространенным охлажденным посолом предусматривается охлаждение рыбы в специальных охлаждаемых помещениях (при температуре от 0 до плюс 7 °С) или с использованием мелкодробленого льда до температуры от 0 до плюс 5 °С. Крупная жирная рыба обрабатывается методом холодного посола (замораживается льдосолевой смесью с содержанием 16 % NaCl).

5.17. Рыба горячего копчения имеет небольшую соленость (1,5 – 2,5 % NaCl) и подвергается копчению дымом в течение 1 – 4 часов при температуре плюс 80 – 170 °С, что обеспечивает гибель вегетативных форм и инактивацию токсина ботулизма. Реализация готового продукта, изготовленного таким способом не превышает 3 суток. Для увеличения срока хранения рыбы горячего копчения ее рекомендуется замораживать. Рыба холодного копчения содержит 5 – 10 % соли и 48 – 58 % воды.

5.18. Балыки из рыбы осетровых пород могут быть произведены только из специально подготовленной живой, здоровой и немедленно выпотрошенной после улова рыбы.

⁶⁴ Статья 10 ТР ТС 021/2011.

5.19. Молоко и молочные продукты (брынза, сыр и сгущенное молоко) могут содержать споры *C. botulinum*. В процессе хранения их окислительно-восстановительный потенциал может снижаться, создавая анаэробные условия, благоприятные для развития возбудителя. Таким образом, длительно хранящееся стерилизованное или сгущенное консервированное (без сахара) молоко, содержащее споры *C. botulinum* может явиться благоприятной питательной средой для токсинообразования. Для обеспечения безопасности консервированного молока его подвергают термической обработке и контролируют микробиологические показатели. Для обеспечения безопасности сыров проводят пастеризацию сырья (молока), применяют чистые заквасочные культуры и сычужный фермент, крепкую посолку (не ниже 18 % NaCl) и выдержку сыра в первые часы (от 2 часов до трех суток, в зависимости от размера головки сыра и его сорта), а в дальнейшем после посола выдержка при пониженной температуре (не выше плюс 8 – 12 °С).

5.20. При переработке овощного и фруктового сырья опасность представляет загрязнение его почвой. Для мытья овощей, фруктов и зелени рекомендованы автоматизированные способы. При использовании ручного способа мытье осуществляется в проточной или часто сменяемой воде. Для очистки моркови и белых корней их обработка проводится в течение 3 – 5 минут в 3 % NaOH при температуре плюс 80 °С. Мойка огурцов осуществляется в машинах, оборудованных щетками из не адсорбирующего материала или в специальных ваннах для отделения почвы и песка с использованием проточной воды. Зелень перед мойкой для дальнейшего использования тщательно сортируется, удаляются гниющие, сухие и желтые экземпляры. Укроп, листья петрушки, сельдерея и другие ароматизирующие виды промываются на металлических сетках порциями не более 3 – 4 кг с использованием душа в течение 5 – 6 минут при высоте слоя 15 – 20 см.

5.21. Грибы, с пластинчатым или трубчатым (губчатому) строением их нижней части шляпки, могут легко задерживать мелкие частицы почвы, что относит их к числу продуктов, которые подвергают качественному отмыванию. Для мытья рекомендован автоматизированный способ. При использовании ручного метода мытье проводится в проточной или часто сменяемой воде. При производстве маринованных грибов маринад должен иметь значение pH ниже 4,0. Если в подготовленном маринаде содержание уксусной кислоты (по расчету на 100 %) будет не ниже 6 %, при варке концентрация кислоты в растворе понизится за счет воды, содержащейся в грибах, и будет соответствовать оптимальной – 0,6 %. Такие грибы можно хранить при температуре не выше плюс 8 – 10 °С. Соленые и маринованные грибы для обеспечения профилактики ботулизма хранят на холоде, при температуре от 0 до плюс 3 °С.

5.22. Пряности, специи и вспомогательные материалы (например, крахмал, молочный порошок, желатин, мука, соль, крупы), используемые при приготовлении многих продуктов, предназначенных для длительного хранения могут быть обсеменены спорами *C. botulinum*. В этой связи натуральные специи в пищевой промышленности целесообразно заменять эфирными маслами и экстрактами (такие препараты свободны от бактерий). При использовании натуральных сухих специй, они перед добавлением в продукт подвергаются

санитарной обработке. При мойке каждый вид пряностей (например, перец черный и душистый, лавровый лист, гвоздику, мускатный орех) заливается отдельно в чистой посуде 5 – 6-кратным количеством холодной воды и выдерживается при комнатной температуре на 30 – 40 минут, затем вода сливается и пряности замачиваются повторно на 10 – 15 минут. При употреблении пряностей в измельченном виде их предварительно подсушивают. Черный перец, как наиболее обсемененный вид, целесообразно стерилизовать в герметически укупоренной таре в течение 50 минут при температуре плюс 120 °С.

5.23. Произведенные промышленным способом консервы по отношению к возможности развития *C. botulinum* делятся на две группы: а) бескислотные и слабокислотные консервы с pH 4,5 и выше, в них культура ботулизма может размножаться и продуцировать токсин; б) кислотные консервы с pH менее 4,5, в них споры возбудителя не развиваются. Все слабокислотные и бескислотные консервы подвергаются стерилизации при температуре плюс 112 – 125 °С, кислотные консервы пастеризуются при температуре плюс 80 – 100 °С. Стерилизация консервов проводится по режимам, гарантирующим гибель спор ботулизма. Термическая обработка стерилизуемых консервов, не содержащих дополнительных консервантов проводится автоклавированием при температуре плюс 121,1 °С в течение 3 минут. Фруктовые консервы и маринады, благодаря высокому содержанию сахара (варенье, джем, повидло, конфитюр) или высокой кислотности (маринады, соки, соусы, компоты) являются неблагоприятной средой для развития возбудителей ботулизма. Причиной образования токсина ботулизма может быть некачественная обработка сырья, низкая кислотность плодов или замедленная диффузия кислоты из недостаточно сваренных плодов. В случае низкой кислотности плодов (груш, инжира, персиков, абрикос) в консервируемый продукт следует добавлять лимонную кислоту. Некоторые фрукты, в частности абрикосы, вследствие тонкого волосяного покрова трудно отмываются от загрязнения почвой и пылью. При переработке такого сырья устанавливают специальный контроль за качеством мытья. Перед отправкой фруктовых консервов потребителю тщательно отбраковываются и не допускаются в продажу банки, в которых развилась плесень.

5.24. Консервы могут инфицироваться возбудителем ботулизма не только во время подготовки и переработки продуктов, но и после окончания процесса стерилизации во время охлаждения банок. Контроль герметичности пустых и закатанных банок, отбраковка дефектных банок с готовым продуктом, а также контроль водопроводной воды, применяемой на пищевых предприятиях (включая автоклавные отделения), является одним из условий безопасности консервированных продуктов.

5.25. Общими правилами профилактики ботулизма при промышленном производстве баночных консервов являются:

1) поддержание на предприятии в надлежащем санитарном состоянии помещений, аппаратуры и оборудования⁶⁵;

⁶⁵ МР 3.5.0353-24 «Методические рекомендации по организации санитарной обработки помещений, оборудования и инвентаря на предприятиях пищевой промышленности», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека, Главным Государственным санитарным врачом Российской Федерации 16.09.2024.

- 2) тщательная мойка сырья и обработка вспомогательных материалов, использование качественной питьевой воды;
- 3) соблюдение технологических параметров производства и готовых продуктов (например, кислотности, влажности, температуры, pH);
- 4) упаковка продукции в проверенную на герметичность тару с контролем работы закаточных машин;
- 5) применение режимов стерилизации, адекватных по термическому воздействию гибели спор возбудителя ботулизма;
- 6) микробиологический контроль поступающего сырья, подготовленных полуфабрикатов и готовой продукции;
- 7) санитарно-микробиологический контроль производственных линий (например, аппаратуры, оборудования).

Рекомендации при изготовлении консервированных продуктов питания в домашних условиях

5.26. Из мясных продуктов домашнего приготовления наибольшую опасность в отношении ботулизма представляют сырокопченые окорока. В домашних условиях возможны санитарные и технологические нарушения, приводящие к заражению мяса возбудителем ботулизма, его последующему размножению и токсинообразованию. Санитарно-технологические нарушения могут быть обусловлены:

- загрязнением туши частицами земли и навоза, инфицированного спорами при убое животного на земле;
- применением теплого посола окороков в летнее время (при отсутствии льда, ледника, холодильника), в результате чего происходит прорастание спор, размножение вегетативных форм с образованием токсина внутри окорока, куда не успела проникнуть соль;
- использованием холодного копчения при температуре окружающего окорок дыма, не превышающей плюс 35 – 40 °С. После такого копчения окорок может выдерживать хранение в течение нескольких месяцев без признаков порчи (так как элементы коптильного дыма препятствуют дальнейшему размножению возбудителя), однако токсин, образовавшийся ранее, будет сохраняться.

Не рекомендовано употреблять сырокопченые окорока после длительного хранения в сыром виде без последующей проварки, в ходе которой токсин и вегетативные формы возбудителя ботулизма будут уничтожены.

5.27. Для приготовления солено-вяленой и копченой рыбы свежельвленной рыбу целесообразно подвергнуть быстрому охлаждению или замораживанию. В холодное время года этому способствует природный холод, в теплое время – холодильник. Перед посолом рыбу рекомендовано выпотрошить, что удалит вместе с кишечником находящуюся в ней микрофлору, и даст возможность быстрее проникнуть соль в ткани. При засолке концентрация соли не должна быть ниже 6 – 8 %, время засолки от 2 до 6 – 7 дней (в зависимости от размера тушки). Посол рыбы осетровых пород в домашних условиях не проводится.

5.28. Продукты растительного происхождения (например, фрукты, овощи, зелень) в домашних условиях можно заготавливать впрок только путем маринования или соления с добавлением достаточного количества кислоты и соли в открытой для доступа воздуха таре. Мытье проводится тщательно с использованием щеток в проточной воде или меняя воду несколько раз. Особое внимание уделяется зелени, стелящейся по земле и плохо поддающейся промывке. Продукты, не содержащие в своем составе естественной кислоты (например, огурцы, зеленый горошек), консервировать можно только с добавлением кислоты. Лежалые, подвергшиеся порче овощи, фрукты, ягоды подлежат выбраковке.

5.29. При приготовлении грибов развитие вегетативных форм и токсинообразование *C. botulinum* возможно в рассоле при содержании соли ниже 0,6 % и pH выше 4,6. Развитию вегетативных форм и токсина способствует длительное хранение соленых и маринованных грибов при комнатной температуре. В связи с этим при домашней заготовке грибов следует соблюдать рецептуру, а именно содержание уксусной кислоты в маринаде – не ниже 6 %, условия хранения в холодильнике – не выше плюс 6 °С. Не рекомендовано использовать герметичные консервные банки.

5.30. При заготовке баночных консервов в домашних условиях для температурной обработки рекомендуется использовать современные автоклавы для домашнего консервирования. Тепловая обработка в кипящей воде, температура которой не может превысить плюс 100 °С исключает возможность должным образом подвергнуть продукты заключительной термической обработке (стерилизации). Баночные консервы, приготовленные кипячением следует считать ненадежными в отношении гарантии от ботулизма после их приема в пищу. В этой связи рыбные и мясные консервы, приготовленные данным способом перед употреблением необходимо подвергнуть повторному кипячению в течение 15 – 20 минут с целью разрушения токсина. В процессе хранения следят за целостностью упаковки, изменением цвета, консистенцией продукта (если он находится в прозрачной таре). Все продукты домашнего консервирования следует хранить в условиях холодильника с отбраковкой и уничтожением бомбажных банок.

5.31. Не рекомендуется приобретать консервированные продукты домашнего изготовления у посторонних лиц, в несанкционированных местах торговли.

VI. ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОГО РИСКА ПРИЧИНЕНИЯ ВРЕДА ЗДОРОВЬЮ НАСЕЛЕНИЯ, ОБУСЛОВЛЕННОГО БОТУЛИЗМОМ

6.1. В отношении пищевых продуктов промышленного производства одной из мер профилактики является реализация контрольно-надзорных мероприятий⁶⁶, направленных на соблюдение санитарно-эпидемиологических требований производителями пищевых продуктов и предотвращение их контаминации *C. botulinum*. Контрольно-надзорные мероприятия осуществляются

⁶⁶ Федеральный закон от 31.07.2020 № 248-ФЗ.

на основе риск-ориентированной модели⁶⁷, использование которой позволяет определять частоту и объем контрольных (надзорных) мероприятий в зависимости от категории пищевой продукции по критериям потенциального риска причинения вреда здоровью населения.

6.2. К основным положениям оценки потенциального риска причинения вреда здоровью населения, обусловленного ботулизмом, для категорирования продукции относятся следующие:

- риск причинения вреда здоровью населения, обусловленный развитием пищевого ботулизма, возникает в условиях нарушения объектом государственного контроля (надзора), осуществляющим производство и (или) обращение пищевой продукции, предъявляемых к нему обязательных санитарно-эпидемиологических требований;

- нарушение обязательных требований к продукции определяет вероятность нарушения здоровья населения;

- оценка риска основывается на объективных данных, включая государственную статистическую отчетность и научно-обоснованные данные о факторах, способствующих развитию пищевого ботулизма в пищевой продукции;

- отнесение объекта государственного контроля (надзора) к конкретной категории по риску причинения вреда здоровью населения является основанием для установления периодичности контрольных (надзорных) мероприятий, определяет объемы и содержание контрольных (надзорных) мероприятий;

- порядок и критерии отнесения объекта государственного контроля (надзора) к той или иной категории риска являются единообразными для всех объектов надзора независимо от вида деятельности и форм собственности.

6.3. Потенциальный риск причинения вреда здоровью, обусловленного заболеванием ботулизмом, связанным с потреблением пищевой продукции, с учетом того, что заболевание развивается при каждом употреблении продукции, содержащей *C. botulinum* определяется по формуле (1):

$$R_{ij} = PD_{ij} \cdot CF_{ij} \cdot G, \quad (1)$$

где: R_{ij} – потенциальный риск причинения вреда здоровью при потреблении пищевой продукции i -го вида j -го производителя, содержащий *C. botulinum* с ботулотоксином;

PD_{ij} – вероятность обнаружения *C. botulinum* в потенциально опасной пищевой продукции i -го вида j -го производителя, в год;

CF_{ij} – частота потребления потенциально опасной пищевой продукции i -го вида j -го производителя, порций в год на человека;

G – коэффициент тяжести заболевания ботулизмом.

⁶⁷ МР 5.1.0116-17 «Риск-ориентированная модель контрольно-надзорной деятельности в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия. Классификация хозяйствующих субъектов, видов деятельности и объектов надзора по потенциальному риску причинения вреда здоровью человека для организации плановых контрольно-надзорных мероприятий», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека, Главным Государственным санитарным врачом Российской Федерации 11.08.2017 (далее – МР 5.1.0116-17).

Рекомендуемый перечень потенциально опасной пищевой продукции представлен в приложении 3 к настоящим МУ.

Показатель вероятности обнаружения *C. botulinum* в пищевой продукции определяется с учетом вида продукции и производителя как отношение результатов исследований продукции *i*-го вида *j*-го производителя с нарушением обязательных требований по содержанию *C. botulinum* к общему числу исследований *i*-го вида *j*-го производителя, формула (2):

$$PD_{ij} = \frac{n_{ij}}{N_{ij}}, \quad (2)$$

где: PD_{ij} – показатель вероятности обнаружения *C. botulinum* в пищевой продукции;

n_{ij} – число исследований пищевой продукции *i*-го вида *j*-го производителя с нарушением обязательных требований по содержанию *C. botulinum*, в год;

N_{ij} – общее число исследований пищевой продукции *i*-го вида *j*-го производителя пищевой продукции на содержание *C. botulinum*, в год.

Частота потребления продукции, потенциально опасной в отношении распространения ботулизма, характеризующая масштаб в виде доли населения потенциально потребляющего пищевую продукцию *i*-го вида *j*-го производителя, определяется с учетом результатов специальных исследований оценки потребления такой пищевой продукции (методом анализа частоты потребления, 24 часового воспроизведения фактического питания), данных официальной статистики и мониторинга за структурой питания населения, в соответствии с формулой (3):

$$CF_{ij} = \frac{Pm_{ij}}{Pop}, \quad (3)$$

где: CF_{ij} – частота потребления продукции потенциально опасной в отношении распространения ботулизма;

Pm_{ij} – количество порций потенциально опасной пищевой продукции *i*-го вида, *j*-производителя порций в год;

Pop – численность населения, потенциально потребляющего пищевую продукцию *i*-го вида, чел.

Количество порций потенциально опасной пищевой продукции *i*-го вида, *j*-производителя кг в год рассчитывается по формуле (4):

$$Pm_{ij} = \frac{V_{ij}}{v_{ij}}, \quad (4)$$

где: Pm_{ij} – количество порций потенциально опасной пищевой продукции *i*-го вида, *j*-производителя порций в год;

V_{ij} – объем производимой потенциально опасной пищевой продукции *i*-го вида *j*-производителя, кг/год;

v_{ij} – объем упаковки потенциально опасной пищевой продукции, кг на порцию (при отсутствии данных, объем принимается равной 0,1 кг на порцию).

В случае если величина CF по расчетам выше 1, она принимается за 1, что указывает на возможность потребления потенциально опасной пищевой продукции *i*-го вида *j*-производителя всем населением.

Коэффициент тяжести заболевания пищевым ботулизмом, принимая данное состояние как острый случай инфекционного заболевания (отравления ботулотоксином) тяжелой формы [8], составляет 0,133.

Пример реализации предлагаемого подхода представлен в методических документах⁶⁸.

6.4. Полученная величина риска причинения вреда здоровью при потреблении потенциально опасной пищевой продукции позволит отнести ее к определенной категории риска (таблица 8) для последующего планирования надзорных мероприятий.

Таблица 8

Категории риска продукции, обращаемой на потребительском рынке, по критериям риска причинения вреда здоровью потребителя

Категория риска	Характеристика потенциального риска причинения вреда здоровью	Диапазон значений потенциального риска причинения вреда здоровью (R_{ij})
1 категория риска	Чрезвычайно высокий	Более 1×10^{-1}
2 категория риска	Высокий	$10^{-2} < R \leq 1 \times 10^{-1}$
3 категория риска	Значительный	$10^{-3} < R \leq 1 \times 10^{-2}$
4 категория риска	Средний	$10^{-4} < R \leq 1 \times 10^{-3}$
5 категория риска	Умеренный	$10^{-6} < R \leq 1 \times 10^{-4}$
6 категория риска	Низкий	$R < 10^{-6}$

6.5. Отнесение продукции к конкретной категории риска является основанием для определения периодичности плановых проверок, в том числе лабораторных исследований пищевой продукции при проведении контрольных (надзорных) мероприятий в отношении юридических лиц, индивидуальных предпринимателей и физических лиц, для которых установлена частота плановых проверок в соответствии с методическим документом⁶⁹.

6.6. В случае, если в пищевой продукции *i*-го вида, *j*-производителя не обнаружены пробы несоответствующие методическим документам⁷⁰ в отношении *C. botulinum*, то пищевая продукция этого производителя может быть отнесена к категории низкого потенциального риска.

⁶⁸ МР 5.1.0116-17.

⁶⁹ Постановление Правительства Российской Федерации от 30.06.2021 № 1100 «О федеральном государственном санитарно-эпидемиологическом контроле (надзоре)».

⁷⁰ МР 5.1.0116-17.

Для сбора информации у юридических лиц, индивидуальных предпринимателей и физических лиц, участвующих в производстве и (или) изготовлении пищевой продукции, с целью оценки соблюдения санитарно-эпидемиологических требований⁷¹, методических документов⁷² и технических регламентов⁷³ рекомендуется использовать опросные листы (приложение 5 к настоящим МУ).

⁷¹ СанПиН 2.3/2.4.3590-20.

⁷² МР 5.1.0096-14 «Методические подходы к организации оценки процессов производства (изготовления) пищевой продукции на основе принципов ХАССП», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека, Главным Государственным санитарным врачом Российской Федерации 18.12.2014.

⁷³ ТР ТС 021/2011; ТР ТС 034/2013.

Техника постановки биологической пробы⁷⁴

1.1. Количество белых мышей или морских свинок, необходимых для постановки биологической пробы, при постановке защитного теста, проведении реакции нейтрализации и при типировании ботулинических токсинов с разведенными типоспецифическими сыворотками, равняется числу разведений исходной жидкости (с учетом использования при низком титре ботулинического токсина исходной жидкости без разведения), умноженному на количество типов моновалентных двух-, трех- или поливалентных сывороток, применяемых для постановки защитного теста или реакции нейтрализации и типирования ботулинических токсинов в исследуемом продукте, и умноженному на количество мышей в каждом варианте опыта – обычно на две особи.

1.2. По клеткам или банкам рассаживают белых мышей, помещая не более двадцати мышей одного пола в каждую клетку или банку. Во время постановки опытов перераспределения мышей по клеткам не допускается.

1.3. Работы по заражению, вскрытию и содержанию биопробных животных, другие манипуляции с инфицированными животными и членистоногими, первичную обработку проб зоолого-паразитологического и секционного материала выполняют в виварии в блоке для работы с инфицированными животными. Все виды работ в помещениях блока для инфицированных животных осуществлять с соблюдением принципа парности (не менее двух человек, один из которых врач или научный сотрудник)⁷⁵.

1.4. Проведение биологической пробы осуществляется двумя специалистами в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁷⁶. Все работы в помещениях блока для инфицированных животных осуществляются с соблюдением принципа парности. При проведении биологической пробы сотрудники надевают резиновые перчатки. Первый сотрудник осуществляет фиксацию лабораторного животного, для чего захватывает кожу мыши на затылке, а хвост и левую заднюю лапу другой рукой. При этом мышь держат головой вниз так, чтобы кишечник сместился книзу от места укола. Второй сотрудник обрабатывает спиртом место укола и вводит иглу шприца в горизонтальном направлении между кожей и мышцами с левой стороны в задней трети живота, затем иглу слегка поворачивает в вертикальном направлении и осторожным движением продвигает вперед. Момент проникновения иглы в брюшную полость ощущает по исчезающему под рукой сопротивлению. После проникновения иглы в брюшную полость большим пальцем правой руки медленно нажимает поршень шприца и, следя за градуировкой на цилиндре, вводит определенное количество жидкости в

⁷⁴ Пункты 238 – 269 СанПиН 3.3686-21.

⁷⁵ Пункт 204 СанПиН 3.3686-21.

⁷⁶ Пункт 204 СанПиН 3.3686-21.

брюшную полость. Затем иглу вынимает, животное метят и помещают в клетку для наблюдения.

1.5. Лабораторных животных метят путем окрашивания их шерсти по определенной схеме раствором карболового фуксина, бриллиантового зеленого, раствором пикриновой кислоты либо фломастерами.

Одним цветом, основным (желательно красным) метят лабораторных животных с 1 по 9 номер.

Двумя цветами – красным и дополнительным – желтым или зеленым – метят лабораторных животных с двузначными номерами: с 10 до 99 включительно, причем десятки обозначают дополнительным цветом, а единицы – основным.

В зависимости от места окраски, пятна краски (желательно фуксина) соответствуют следующим условным номерам:

на левой передней лапе – 1, на левом боку – 2, на левой задней лапе – 3, на голове – 4, на спине – 5, у основания хвоста – 6, на правой передней лапе – 7, на правом боку – 8, на правой задней лапе – 9.

При комбинированной окраске двумя цветами разных мест получают любое двузначное число.

Питательные среды, используемые при выявлении возбудителя ботулизма

2.1. Для выделения возбудителя ботулизма используют коммерческие питательные среды или среды, приготовленные в лаборатории в соответствии с изложенными ниже требованиями. Приготовление и контроль готовых питательных сред осуществляют в соответствии с документами по стандартизации⁷⁷, а также методическими документами⁷⁸.

2.2. Микроорганизмы *C. botulinum* не обладает особыми питательными потребностями. Для работы со штаммами *C. botulinum* или материалом, предположительно содержащим *C. botulinum*, используют жидкие и полужидкие среды обогащения и плотные (агаризованные) питательные среды.

2.3. В качестве сред обогащения используют мясные бульоны, бульоны с кусочки животных тканей (например, среду Китта-Тароцци), тиогликолевую среду или другие среды, содержащие редуцирующие вещества, такие как тиогликолят натрия, цистеина гидрохлорид, сульфит натрия, дитиотреитол и дитионит натрия. Для контроля за степенью насыщения кислородом в состав питательных сред добавляют специальные редокс-индикаторы (метиленовый синий, резазурин).

2.4. В средах типа Китта-Тароцци рост *C. botulinum* начинается вокруг мясных кусочков в виде помутнения среды, в процессе роста может наблюдаться почернение мяса, газообразование и неприятный запах из-за протеолитического действия микроба.

2.5. Перед использованием жидкие и полужидкие среды, приготовленные заранее, регенерируют в инокуляционных емкостях (пробирках или флаконах) путем прогревания на кипящей водяной бане в течение 20 – 30 минут, если не указано иное.

2.6. Агаризованные среды чаще всего используют с селективными добавками для подавления микробов-ассоциантов, в качестве которых рекомендуют смесь циклосерина (250 мг/л), сульфаметоксазола (76 мг/л) и триметоприма (4 мг/л), сульфадиазин натрия (50,00 мг/л), канамицин сульфат (6 мг/л), полимиксин В сульфат (15,000 ед/л), олеандомицин фосфат (0,25 мг/л), полимиксин В сульфат (5,000 ед/л). Селективные добавки растворяют в 2 мл стерильной дистиллированной воды и вносят одну из них к 500 мл среды, охлажденной предварительно до температуры плюс 45 – 50 °С. После внесения

⁷⁷ ГОСТ Р 70393-2022 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Приготовление, производство, хранение и испытания питательных сред», введенный приказом Росстандарта от 13.11.2022 № 1132-ст; ГОСТ ISO 11133-2016 «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред», введенный приказом Росстандарта от 07.11.2016 № 1605-ст.

⁷⁸ МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18.01.2008.

всех необходимых компонентов среду разливают в чашки Петри, после застывания подсушивают.

2.7. Для выявления *C. botulinum* типа Е в среду добавляют трипсин до конечной концентрации 0,1 % (или панкреатин). Приготовление раствора трипсина: 1,5 г трипсина растворяют в 100 мл раствора фосфатного буфера с рН 6,0. Раствор трипсина стерилизуют фильтрованием через керамический или мембранный фильтр с размерами пор 0,40 – 0,45 мкм или другой эквивалентный фильтр. Стерильный раствор трипсина вносят в регенерированную и охлажденную питательную среду асептически непосредственно перед использованием из расчета 1 мл раствора трипсина на 15 мл среды. Трипсин применяют для активизации протоксина *C. botulinum*. Так как для таких исследований требуется трипсин в довольно больших количествах, его можно заменить эквивалентным количеством панкреатина. Кроме того, такие среды можно брать в пробирках с объемом среды 15 – 20 мл. Панкреатин следует готовить в виде 1 % раствора, стерилизовать путем фильтрации через керамический или мембранный фильтр с размерами пор 0,40 – 0,45 мкм или другой эквивалентный фильтр и добавлять во флаконы, которые будут инкубировать при температуре плюс 30 °С, из расчета 1 мл 1 % раствора панкреатина на 10 мл среды после прогрева при температуре плюс 60 °С 15 минут.

2.8. В работе могут быть использованы среды, предназначенные для выявления клостридий по сульфитредуцирующему признаку, на которых *C. botulinum* при глубинном посеве формируют черные колонии, а при поверхностном посеве центр колоний может быть окрашен в черный цвет.

2.9. Яично-желточную эмульсию для приготовления плотных сред можно использовать стерильную коммерческую или приготовить в лабораторных условиях. Приготовление яично-желточной эмульсии: свежие куриные яйца моют, ополаскивают холодной водой, замачивают в 3 % растворе перекиси водорода на 30 мин, затем обсушивают, опускают в 70 % или 80 % этиловый спирт и высушивают. Разбивают каждое яйцо, соблюдая правила асептики, в стерильную чашку Петри и отделяют желток от белка. Помещают желтки в стерильную колбу или флакон с 25 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно ресуспендируют. Нагревают смесь на водяной бане при температуре плюс (45±0,5) °С в течение 2 часов, оставляют на 18 – 24 часов при температуре от 0 до плюс 5 °С для того, чтобы сформировался осадок. С соблюдением правил асептики собирают эмульсию над осадком. Эмульсию хранят при температуре плюс (4±2) °С не более 72 часов. Добавляют к расплавленной и охлажденной до температуры плюс 50 °С среде из расчета 80 мл яично-желточной эмульсии на 1000 мл среды, тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри. Чашки хранят при температуре плюс (4±2) °С не более 2 суток, перед использованием подсушивают⁷⁹. Применяют для определения способности *C. botulinum* давать положительную реакцию с яичным желтком.

2.10. В средах типа Китта-Тароцци рост *C. botulinum* начинается вокруг мясных кусочков в виде помутнения среды, в процессе роста может наблюдаться

⁷⁹ ГОСТ 26670-91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов», введенный постановлением Госстандарта СССР от 25.12.1991 № 2117 (далее – ГОСТ 26670-91).

почернение мяса, газообразование и неприятный запах из-за протеолитического действия микроба.

2.11. Плотные питательные среды для выделения и культивирования *C. botulinum*:

- селективная среда для выделения *C. botulinum* из пищевых продуктов с дополнительным внесением циклосерина и сульфадиметоксина и триметоприма;
- селективная среда для выделения *C. botulinum* из пищевых образцов;
- анаэробный лецитин – липазный агар;
- печеночно-глицериновая среда;
- среда для определения и культивирования мезофильных и спорообразующих анаэробов;
- модифицированная среда Вильсона-Блера с дополнительным внесением полимикина сульфата и сульфадиазина натрия;
- среда для определения и культивирования мезофильных и спорообразующих анаэробов;
- глюкозо-триптозный агар с циклосерином;
- триптиказо – соевый агар;
- улучшенная клостридиальная среда (англ. Reinforced clostridial agar, R.C.M.);
- железосульфитный агар (в модификациях 1 – 4) Питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях;
- питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях с дополнительным внесением желточной эмульсии, циклосерина и сульфаметоксазола и триметоприма;
- перфрингенс агар основа (англ. Perfringens Agar Base, далее – O.P.S.P);
- клостридиальный агар (англ. Clostridial Agar);
- анаэробный агар.

жидкие и полужидкие питательные среды:

- среда Китта-Тароцци;
- среда с кусочками вареного мяса (Cooked Meat Medium);
- питательная среда для контроля стерильности лекарственных средств (тиогликолевая среда);
- тиогликолевая среда с резазурином;
- триптиказо-пептонно-глюкозный дрожжевой бульон;
- триптиказо-пептонно-глюкозный дрожжевой бульон с трипсином, триптиказо-пептонно-глюкозный дрожжевой бульон с циклосерином и др.;
- бульон Хоттингера.

2.12. Ниже приведен перечень питательных сред лабораторного изготовления:

2.12.1. Агар желточный для анаэробов: к 1000 мл дистиллированной воды добавляют 25,0 мл дрожжевого экстракта, 5,0 г триптона или ферментативного гидролизата казеина, 20,0 г пептона, 5,0 г хлористого натрия и 20,0 г агара. Среду нагревают на кипящей водяной бане до расплавления агара, устанавливают pH (6,9±0,1), разливают во флаконы и стерилизуют при температуре плюс (121±1) °С в течение 20 минут. Хранят при температуре плюс (4±2) °С не более 28 суток.

Яично-желточную эмульсию добавляют к расплавленной и охлажденной до температуры плюс 50 °С среде из расчета 80 мл яично-желточной эмульсии на 1000 мл среды, тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри, подсушивают. Чашки хранят при температуре плюс (4±2) °С не более 2 суток.

2.12.2. Агар печеночно-желточный; агар печеночный. Готовят в соответствии с документами по стандартизации⁸⁰. Яично-желточную эмульсию добавляют к расплавленному и охлажденному до температуры плюс 50 °С печеночному агару из расчета 80 мл желточной эмульсии на 1000 мл агара, тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри. Чашки хранят при температуре плюс (4±2) °С не более 2 суток, перед использованием подсушивают⁸¹. При отсутствии печеночного агара допускается заменять его мясо-пептонным агаром.

2.12.3. Агар мясо-пептонный готовят в соответствии с инструкцией производителя и в соответствии с документами по стандартизации⁸². Или 10 г пептона и 5 г хлористого натрия добавляют к 1000 мл мясной воды. Устанавливают рН 7,0 – 7,2, кипятят, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют при температуре плюс (121±1) °С в течение 20 минут. При выпадении осадка в мясо-пептонном бульоне его вторично фильтруют с последующей стерилизацией.

Для приготовления мясо-пептонного агара в 1000 мл мясо-пептонного бульона перед стерилизацией добавляют 15 – 20 г агара и кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. Устанавливают рН 7,0 – 7,2, разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют при температуре плюс (121±1) °С в течение 20 минут.

Применяют для культивирования мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

2.12.4. Агар сахарный кровяной по Цейсслеру. Готовят в соответствии с инструкцией производителя и в соответствии с документами по стандартизации⁸³.

2.12.5. Бульон триптиказо-пептонно-глюкозный с дрожжевым экстрактом (англ. Trypticase-peptone-glucose broth with yeast extract, TPGY) и с трипсином (англ. Trypticase-peptone-glucose broth with yeast extract with trypsin, TPGYT): 50,0 г триптического перевара казеина, 5,0 г пептона, 100,0 мл дрожжевого экстракта, 4,0 г глюкозы и 1,0 г тиогликолята натрия добавляют к 900 мл дистиллированной воды, устанавливают рН (7,1±0,1). Стерилизуют при температуре плюс (121±1) °С пробирки в течение 10 минут, флаконы – в течение 15 минут. Хранят при комнатной температуре не более 7 суток. Для культивирования *C. botulinum* тип Е, образующих протоксин, перед употреблением к 1000 мл бульона добавляют 60 мл 1,5 % раствора трипсина в фосфатном буферном растворе.

2.12.6. Питательный агар с кровью и глюкозой: к 1000 мл деионированной воды добавляют 17,0 г ферментативного пептона, 15 мл дрожжевого экстракта, 5,0

⁸⁰ ГОСТ 10444.1-84 «Методы микробиологического анализа. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе», введенный постановлением Госстандарта СССР от 17.01.84 (далее – ГОСТ 10444.1-84).

⁸¹ ГОСТ 26670-91.

⁸² ГОСТ 10444.1-84.

⁸³ ГОСТ 10444.1-84.

г натрия хлористого, $(17,0 \pm 3,0)$ г агара, 20,0 г глюкозы, устанавливают рН $(7,2 \pm 0,2)$, стерилизуют при температуре плюс (121 ± 1) °С в течение 20 минут. После стерилизации и охлаждения температуры плюс до 50 °С добавляют 200 мл бараньей крови. Допускается добавление в среду неомидина до конечной концентрации 50 мг/л или циклосерина до 400 мг/л.

2.12.7. Питательный агар с яичным желтком и лактозой: к 1000 мл деионизированной воды добавляют 17,0 г ферментативного пептона, 15 мл дрожжевого экстракта, 5,0 г натрия хлористого, $(17,0 \pm 3,0)$ г агара, устанавливают рН $(7,2 \pm 0,2)$, стерилизуют при температуре плюс (121 ± 1) °С в течение 20 минут. В стерильную расплавленную среду добавляют 20,0 г лактозы, смесь прогревают в течение 30 минут в водяной бане в кипящей воде. После охлаждения до температуры плюс 50 °С добавляют асептически 10 мл 0,4 % раствора бромкрезолпурпурного и 100 мл эмульсии яичного желтка.

2.12.8. Среда для определения ферментации углеводов анаэробами.

Основа среды для определения ферментации углеводов анаэробами.

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Ферментативный гидролизат казеина	15,0
Дрожжевой экстракт	7,0
L-Цистеин	0,25
Натрия хлорид	2,5
Аскорбиновая кислота	0,1
Натрия тиогликолят	0,5
Бромтимоловый синий	0,01
Агар	0,75

Конечное значение рН среды 7,0.

Приготовление: вносят 26,0 г порошка в 500 мл дистиллированной воды до полного растворения частиц. Стерилизуют автоклавированием при 1 атм (плюс 121 °С) в течение 15 минут. Охлаждают до температуры плюс 45 – 50 °С, асептически добавляют 6,25 мл 10 % стерильного раствора соответствующего углевода. Тщательно перемешивают, разливают по пробиркам с поплавками.

2.12.9. Для транспортировки биологического материала с возможным содержанием *C. botulinum* может быть использована Универсальная транспортная система Амиеса (Эймса).

Состав среды в г на 1 л дистиллированной воды:

Натрия хлорид	2,5
Глюкоза	5,0
Натрия тиогликолят	0,5
Цистеина гидрохлорид	0,75
Натрий углекислый	0,8
Агар	0,75
Конечное значение рН среды	7,2

2.12.10. Улучшенная клостридиальная среда. Применяют для культивирования *C. botulinum*. Готовят в соответствии с инструкцией производителя и в соответствии с документами по стандартизации⁸⁴.

⁸⁴ ГОСТ 10444.1-84.

2.12.11. O.P.S.P.

Селективная среда для выделения и подсчета *C. perfringens* в пищевых продуктах и объектах окружающей среды.

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Гидролизат казеина	15,0
Папаиновый перевар соевой муки	5,0
Дрожжевой экстракт	5,0
Печеночный экстракт	7,0
Железа аммонийного цитрат	1,0
Натрия гидросульфит	1,0
Трис-буфер	1,5
Агар-агар	15,0
Агар-агар	13,5
Конечное значение pH среды	7,2

Приготовление: размешать 23,25 г/л порошка в 475 мл дистиллированной воды. Стерилизовать автоклавированием при температуре плюс 121 °С в течение 15 минут, охладить до температуры плюс 50 °С и внести яичную эмульсию в объеме 25 мл и соответствующие селективные добавки.

Селективные добавки для Перфрингенс агар основной: D циклосерин – 200,00 мг; Сульфадиазин натрия – 50,00 мг; Канамицин сульфат – 6 мг; Полимиксин В сульфат – 15,000 ед.; Олеандомицин фосфат – 0,25 мг; Полимиксин В сульфат – 5,000 ед. Селективные добавки растворяют в 2 мл стерильной дистиллированной воды и вносят одну из них к 500 мл среды, охлажденной предварительно до температуры плюс 45 – 50 °С.

После внесения всех необходимых компонентов среду разливают в чашки Петри, после застывания подсушивают. После посева наносят второй слой среды для создания анаэробных условий. Для создания второго слоя используют одну из следующих сред:

2.12.12. Клостридиальный агар (англ. Clostridial Agar). Применяют для селективного выделения *Clostridium* spp. из смешанных культур в клиническом материале.

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Гидролизат казеина	12,00
Папаиновый перевар соевой муки	3,00
Глюкоза	6,00
Натрия хлорид	2,50
Натрия тиогликолят	1,00
L-Цистеин	0,25
Формальдегида сульфосиалат натрий	1,00
Неомицина сульфат	0,15
Натрия азид	0,2
Агар-агар	14,5
Конечное значение pH среды	7,2

Приготовление: размешать 46 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятить до полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при

0,9 атм (температура плюс 118 °С) в течение 15 минут. Можно добавить 5 % крови барана для улучшения ростовых свойств при выделении клостридий.

2.12.13. Анаэробный агар.

Агар для культивирования анаэробных бактерий, в частности видов *Clostridium* spp.

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Гидролизат казеина	20,00
Глюкоза	10,00
Натрия хлорид	5,00
Натрия тиогликолят	2,00
L-Цистеин	0,25
Формальдегида сульфосиалат натрий	1,00
Метиленовый синий	0,002
Агар-агар	20,0

Конечное значение рН среды 7,2.

Приготовление: размешать 29,0 г порошка в 500 мл дистиллированной воды, кипятить до полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм (температура плюс 121 °С) в течение 15 минут.

2.12.14. Сульфитный агар (модификация 1).

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Панкреатический гидролизат казеина	15,0
Дрожжевой экстракт	10,0
Железа цитрат	1,0
Натрия хлорид	2,5
Натрия сульфит	0,5
Агар	1,5

Конечное значение рН среды 7,0 – 7,4.

Приготовление: размешать 28,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды, прогревать в течение 2 – 3 минут до полного растворения частиц, разливают в пробирки по 10 мл. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм (температура плюс 121 °С) в течение 15 минут.

2.12.15. Сульфитный агар (модификация 2).

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Панкреатический гидролизат казеина	15,0
Дрожжевой экстракт	10,0
Железа цитрат	1,0
Натрия сульфит	0,5
Агар	7,0

Конечное значение рН среды 7,0 – 7,4.

Приготовление: размешать 33,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды, прогревать в течение 2 – 3 минут до полного растворения частиц, разливать в пробирки по 10 мл. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм (температура плюс 121 °С) в течение 15 минут.

2.12.16. Сульфитный агар (модификация 3).

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Панкреатический гидролизат казеина	15,0
------------------------------------	------

Дрожжевой экстракт	10,0
Железа цитрат	1,0
Натрия сульфит	0,5
Агар	17,5
Конечное значение pH среды	7,0 – 7,4.

Приготовление: размешать 46,5 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды, прогреть в течение 2 – 3 минут до полного растворения частиц, разливать в пробирки по 10 мл. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм (температура плюс 121 °С) в течение 15 минут. Охлаждают до температуры плюс 50 °С и вносят яичную эмульсию в объеме 25 мл и соответствующие селективные добавки.

2.12.17. Сульфитный агар (модификация 4).

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Панкреатический гидролизат казеина	15,0
Дрожжевой экстракт	10,0
L-Цистеин	0,25
Натрия хлорид	2,5
Глюкоза	5,0
Натрия тиогликолят	0,5
Цистеина гидрохлорид	0,75
Натрий углекислый	0,8
Агар	0,75
Конечное значение pH среды	7,2.

Приготовление: размешать 30,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды, прогреть в течение 2 минут до полного растворения частиц, разливать в пробирки по 10 мл. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм (температура плюс 121 °С) в течение 15 минут. Можно внести 0,5 мл крови после охлаждения среды и соответствующую селективную добавку.

2.12.18. Бульон Хоттингера.

Применяют для культивирования *C. botulinum*. Готовят в соответствии с инструкцией производителя и в соответствии с требованиями⁸⁵.

2.12.19. Среда с кусочками вареного мяса (англ. Cook Meat Medium).

Применяют для выделения и культивирования *C. botulinum*.

2.12.20. Среда Китта-Тароцци с углекислым кальцием.

Применяют для выявления и культивирования *C. botulinum*.

2.12.21. Среда питательная для контроля стерильности.

В состав среды входят: фермент активный гидролизат казеина неглубокой степени расщепления – 15,0 г; витаминный препарат экстракта кормовых дрожжей 5,0 г; натрий хлористый – 6,4 г; глюкоза – 5,0 г; тиогликолят натрия – 0,3 г; цистеина гидрохлорид – 0,75 г; агар – 0,6 г; натрий углекислый – 0,5 – 0,95 г;

Приготовление: размешать 33,0 г сухого порошка в 1000 мл воды, кипятить 2 – 3 минуты при помешивании, фильтровать, разливать во флаконы. Стерилизовать при температуре плюс (121±1) °С в течение 20 минут. Готовая среда должна иметь pH (7,0±0,2). Среду хранят при комнатной температуре не более 7 суток. Применяют для культивирования *C. botulinum*.

⁸⁵ ГОСТ 10444.1-84.

2.12.22. Тиогликолевая среда (питательная среда для контроля стерильности сухая).

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Панкреатический гидролизат казеина	15,0
Дрожжевой экстракт	5,0
L-Цистеин	0,25
Натрия хлорид	2,5
Глюкоза	5,0
Натрия тиогликолят	0,5
Цистеина гидрохлорид	0,75
Натрий углекислый	0,8
Агар	0,75
Конечное значение pH среды	7,2

Приготовление: размешать 30,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды, прогреть в течение 2 минут до полного растворения частиц, разливать в пробирки по 10 мл. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм (температура плюс 121 °C) в течение 15 минут.

Можно внести 0,5 мл крови после охлаждения среды и соответствующую селективную добавку.

2.12.23. Тиогликолиевый бульон с резазурином (используется для детекции анаэробов). Содержит в составе трипказо-соевый экстракт – 15 г, L-цистеин – 0,5 г, декстроза – 5,0 г, натрия хлорид – 2,5 г, натрия тиогликолят – 0,5 г, резазурин – 0,001 г, агар-агар – 0,75 г.

Приготовление: размешать 29,5 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды, разлить по пробиркам по 10 мл, стерилизовать автоклавированием 15 минут при температуре плюс 121 °C.

2.12.24. Печеночный бульон (англ. L. Broth)

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Настой печени	75,0
Панкреатический перевар животной ткани	10,0
Печеночная ткань	20,0
Калия гидрофосфат	1,0
Конечное значение pH среды	6,8.

Приготовление: размешать 64,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Настаивать в течении 15 минут, периодически помешивать. Разливать в пробирки диаметром 10 мм на высоту до 50 мм, чтобы заполнить дно пробирки кусочками печени. Стерилизовать автоклавированием при 0,7 атм (температура плюс 115 °C) в течение 20 минут. Остужать, засеивать пробирки и «запечатывать» их стерильным 2 % агаром. Можно внести 0,5 мл крови после охлаждения среды и соответствующую селективную добавку.

2.12.25 Бульон для выделения клостридий дифференциальный усиленный (Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM)).

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Мясной экстракт	8,0 г
Казеиновый пептон	5,0
Крахмал	1,0

Дисульфит натрия	0,50
Резазурина натриевая соль	0,002
Мясной пептон	5,00
Ацетат натрия	5,00
Глюкоза	1,00
L- цистеина гидрохлорид	0,50
Двойная соль лимоннокислого железа	0,50

Приготовление: размешать 27,5 г среды в 1000 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешивать и кипятить в течение 1 минуты до полного растворения. Разливать в соответствующую посуду и стерилизовать автоклавированием при температуре плюс 121 °С в течение 15 минут. Готовая среда имеет красно – коричневый цвет и хранить при температуре плюс 2 – 8 °С.

2.12.26. Модифицированная среда Дункана-Стронга (Duncan Strong, DS). Данная среда рекомендована для дифференциации *C. perfringens* от других видов *Clostridium* spp. при обследовании пищевых продуктов на основе ферментации раффинозы.

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Протеолетический пептон	15,0
Дрожжевой экстракт	4,0
Натрия тиогликолят	1,0
Натрия фосфат	10,0
Раффиноза	4,0

Конечное значение рН среды 7,8.

Приготовление: размешать 34,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды до полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм (температура плюс 121 °С) в течение 15 минут. Разливать по стерильным пробиркам, предварительно проверив рН среды.

2.12.27. Среда для определения ферментации углеводов анаэробами. Основа среды для определения ферментации углеводов анаэробами.

Состав среды в г на 1000 мл дистиллированной воды:

Ферментативный гидролизат казеина	15,0
Дрожжевой экстракт	7,0
L-Цистеин	0,25
Натрия хлорид	2,5
Аскорбиновая кислота	0,1
Натрия тиогликолят	0,5
Бромтимоловый синий	0,01
Агар	0,75
Конечное значение рН среды	7,0.

Приготовление: размешать 26,0 г порошка в 500 мл дистиллированной воды до полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм (температура плюс 121 °С) в течение 15 минут. Охлаждать до температуры плюс 45 – 50 °С, асептически добавить 6,25 мл 10 % стерильного раствора соответствующего углевода. Тщательно перемешивать, разлить по пробиркам с поплавками.

Рекомендуемый перечень видов пищевой продукции потенциально опасных в отношении распространения ботулизма

3.1. Консервированные пищевые продукты (полные консервы групп А), имеющие рН 4,2 и выше, а также овощные, мясные, мясорастительные, рыба-растительные и рыбные консервированные продукты с нелимитируемой кислотностью, приготовленные без добавления кислоты; компоты, соки и пюре из абрикосов, персиков и груш с рН 3,8 и выше; сгущенные стерилизованные молочные консервы; консервы со сложным сырьевым составом (плодово-ягодные, плодово-овощные и овощные с молочным компонентом).

3.2. Консервированные пищевые продукты (полные консервы групп Б), (консервированные томатопродукты).

3.3. Консервированные пищевые продукты (полные консервы групп В), (консервированные слабокислые овощные маринады, соки, салаты, винегреты и другие продукты, имеющие рН 3,7 – 4,2, в том числе огурцы консервированные, овощные и другие консервы с регулируемой кислотностью).

3.4. Консервированные пищевые продукты (полные консервы групп Г), (консервы овощные с рН ниже 3,7, фруктовые и плодово-ягодные пастеризованные, консервы для общественного питания с сорбиновой кислотой и рН ниже 4,0; консервы из абрикосов, персиков и груш с рН ниже 3,8; соки овощные с рН ниже 3,7, фруктовые (из цитрусовых), плодово-ягодные, в том числе с сахаром, натуральные с мякотью, концентрированные, пастеризованные; соки консервированные из абрикосов, персиков и груш с рН 3,8 и ниже; напитки и концентраты напитков на растительной основе с рН 3,8 и ниже, фасованные методом асептического розлива).

3.5. Консервированная соковая продукция из фруктов и (или) овощей.

3.6. Продукты прикорма на мясной основе. Консервы из мяса (например, говядины, свинины, баранины, птицы), в т.ч. с добавлением субпродуктов.

3.7. Пастеризованные колбаски на мясной основе (с 1,5 лет жизни и старше).

3.8. Продукты прикорма на рыбной основе.

3.9. Рыбо-растительные консервы.

3.10. Продукты для питания дошкольников и школьников: Продукты на мясной основе (Консервы мясные (в т.ч. из мяса птицы)).

**Пример расчета потенциального риска причинения вреда здоровью,
обусловленного заболеванием ботулизмом, связанным с потреблением
потенциально опасной пищевой продукции**

4.1. В 2024 году в Российской Федерации (по данным Единой информационной аналитической системы Роспотребнадзора, «Лабораторное обеспечение») было проведено 45 исследований в отношении кулинарного изделия промышленного производства на основе овощей «Салат Лобио» (Производитель X) на содержание *C. botulinum*. Учитывая число проб несоответствующих НД ($n=3$), показатель вероятности обнаружения (PD) *C. botulinum* в данной продукции в год составил 0,07.

4.2. Для расчета вероятности потребления «Салата Лобио» производителя X, был использован сценарий, при котором предполагается, что поступающая на рынок продукция целиком реализуется в течение срока ее годности. Срок годности для «салата Лобио» (без вскрытия упаковки) производителя X установлен на 5 суток. Следовательно, учитывая, что в год производится 73 партии данного пищевого продукта объемом 172 000 кг (материалы эпидрасследования) количество производимой продукции в год составит 12556000 кг. В виду того, что объем одной порции «салата Лобио», производителя X равна 0,3 кг (в соответствии с этикеткой данного пищевого продукта), рассчитывается количество порций произведенных кг в год данного продукта как отношение количества производимой продукции в год на объем одной порции (кг). Следовательно, количество порций «салата Лобио», производителя X равно 41853333 порции в год.

Принимая во внимание, что численность населения, которая может употребить данную пищевую продукцию (без учета детей в возрасте до двух лет) составляет 139201953 человек⁸⁶, тогда частота потребления потенциально опасной пищевой продукции («салат Лобио» производителя X) будет равна, формула (3):

$$CF_{ij} = \frac{41853333}{139201953} = 0,3, \quad (3)$$

где: CF_{ij} – частота потребления потенциально опасной пищевой продукции i -го вида j -го производителя, порций в год на человека.

Полученная величина свидетельствует о возможности потребления исследуемого продукта (хотя бы 1 порцию в год) третью населения, кроме детей в возрасте до двух лет.

Таким образом, с учетом тяжести заболевания пищевым ботулизмом равного 0,133, показатель потенциального риска причинения вреда здоровью, обусловленного заболеванием ботулизмом, связанным с потреблением пищевой

⁸⁶ Численность населения Российской Федерации по муниципальным образованиям на 1 января 2024 года. Федеральная служба государственной статистики: rosstat.gov.ru/compendium/document/13282 (в свободном доступе).

продукции «Салата Лобио», производителя и вероятности ее потребления потенциально опасной пищевой продукции можно рассчитать величину потенциального риска причинения вреда здоровью, формула (1):

$$R_{ij} = 0,07 \cdot 0,3 \cdot 0,133 = 2,79 \times 10^{-3}, \quad (1)$$

где: R_{ij} – потенциальный риск причинения вреда здоровью при потреблении пищевой продукции i -го вида j -го производителя, содержащий *C. botulinum* с ботулотоксином.

Таким образом, применение методических подходов к расчету потенциального риска причинения вреда здоровью, обусловленного пищевым отравлением ботулотоксином при потреблении готовой овощной продукции в вакуумной упаковке «салат Лобио» от производителя X, позволило отнести данную пищевую продукцию к 3-й категории риска ($R_{ij} = 2,79 \times 10^{-3}$), что характеризуется как значительный потенциальный риск причинения вреда здоровью. Исходя из вышеуказанного, продукция, отнесенная к категории значительного риска, подлежит плановым надзорным мероприятиям – один раз в 3 года.

Точность настоящей оценки риска, обусловленного ботулизмом, связанного с потреблением потенциально опасных пищевых продуктов, может быть ограничена рядом факторов. Так, при расчетах не учитывались фактические данные, включающие объем потребления пищевого продукта, частоты его потребления.

Вместе с тем, полученные результаты следует принимать во внимание для организации санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий в отношении ботулизма.

Опросный лист для сбора информации у юридических лиц, индивидуальных предпринимателей и физических лиц, участвующих в производстве и (или) изготовлении потенциально опасной пищевой продукции по ботулизму

№	Показатель	Оценка		Комментарии
1.	Наличие Декларации о соответствии готовой пищевой продукции потенциально опасной в отношении <i>C. botulinum</i> ⁸⁷	Наличие	Отсутствие	
2.	Оценка документов, подтверждающих безопасность сырья в отношении <i>C. botulinum</i> ⁸⁸	Соответствие	Несоответствие	Техническим регламентам Таможенного союза
3.	Наличие лабораторных исследований продовольственного сырья в отношении <i>C. botulinum</i> на базе лабораторий, аккредитованных и аттестованных в установленном порядке ⁸⁹	Наличие	Отсутствие	
4.	Наличие протоколов ⁹⁰ лабораторных исследований потенциально опасной пищевой продукции в отношении <i>C. botulinum</i> , за период отсутствия контрольных мероприятий с учетом категорией потенциального риска причинения вреда здоровью к которым отнесен объект контроля	Наличие	Отсутствие	Для предприятий, относящихся к 1,2,3 категориям потенциального риска причинения вреда здоровью
5.	Случаи визуальных признаков недоброкачества (деформация упаковки, наличие	Наличие	Отсутствие	

⁸⁷ Статья 21 ТР ТС 021/2011.

⁸⁸ Статья 11 ТР ТС 021/2011.

⁸⁹ Статья 23 ТР ТС 021/2011.

⁹⁰ Приложение 2 ТР ТС 021/2011.

№	Показатель	Оценка		Комментарии
	бомбажа) потенциально опасной готовой пищевой продукции ⁹¹			
6.	Оценка условий хранения готовой продукции ⁹²	Соответствие	Несоответствие	Технические регламенты Таможенного союза
7.	Оценка маркировки (например, сроки годности, условия хранения) ⁹³	Соответствие	Несоответствие	Технические регламенты Таможенного союза
8.	Наличие программы производственного контроля ⁹⁴ , разработанной с учетом ХАССП ⁹⁵	Наличие	Отсутствие	
9.	Соответствие соблюдению последовательности и поточности технологических операций производства (изготовления) пищевой продукции с целью исключения ⁹⁶ загрязнения продовольственного (пищевого) сырья и пищевой продукции	Соответствие	Несоответствие	
10.	Наличие плана по гигиеническому обучению персонала ⁹⁷	Наличие	Отсутствие	

⁹¹ Пункт 8.11 СП 2.3.6.3668-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям деятельности торговых объектов и рынков, реализующих пищевую продукцию», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 20.11.2020 № 36 (зарегистрировано Минюстом России 18.12.2020, регистрационный № 61572), с изменениями, внесенными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 18.06.2025 № 11 (зарегистрировано Минюстом России 24.07.2025, регистрационный № 83056).

⁹² Статья 17 ТР ТС 021/2011.

⁹³ Статья 4 Технического регламента Таможенного союза «Пищевая продукция в части ее маркировки» (ТР ТС 022/2011), утвержденный решением Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 № 881, с изменениями, внесенными решениями Совета Евразийской экономической комиссии от 20.12.2017 № 90, от 14.09.2018 № 75, от 22.04.2024 № 35; ТР ТС 021/2011.

⁹⁴ Статья 22 Федерального закона от 02.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» (далее – Федеральный закон от 02.01.2000 № 29-ФЗ).

⁹⁵ Статья 10 ТР ТС 021/2011.

⁹⁶ Статья 14 ТР ТС 021/2011.

⁹⁷ Приказ Минздрава России от 29.06.2000 № 229 «О профессиональной гигиенической подготовке и аттестации должностных лиц и работников организаций» (зарегистрирован Минюстом России 20.07.2000, регистрационный № 2321); ст. 23 Федерального закона от 02.01.2000 № 29-ФЗ.

Средства измерений, реактивы, питательные среды, вспомогательное оборудование, устройства и материалы

Средства измерений⁹⁸:

Реактивы⁹⁹:

Питательные среды¹⁰⁰:

Вспомогательное оборудование, устройства, материалы¹⁰¹:

- анаэроостат АЭ-01 для культивирования микроорганизмов;
- анаэробная камера (лабораторный анаэробный инкубатор);
- аппарат для встряхивания;
- автоматические пипетирующие дозаторы;
- баллоны с газами (азот, водород, гелий или смесью: азот 80 %, углекислый газ – 10 %, водород – 10 %);
- весы аналитические;
- автоклавы электрические;
- термостаты электрические с автоматическим регулированием;
- холодильники бытовые, поддерживающие температуру плюс 4 – 6 °С;
- холодильники походные (сумки) для транспортировки проб с теплоизоляцией;
- микроскопы биологические световые иммерсионные;
- осветитель ОИ-19;
- лупа в соответствии с требованиями, ГОСТ 25706-83;
- аппараты фильтровальные с диаметром фильтрующей поверхности 32 мм;
- газогенерирующие пакеты типа Анаэрогаз;
- дистиллятор;
- прибор для счета колоний;
- рН-метр;
- сушильные шкафы с регулированием температуры до плюс 200 °С;
- вакуум-насос;
- пластинка с сеткой для счета колоний;
- секундомер;
- часы песочные на 1, 2, 5 мин;
- центрифуга не менее 3000 об/мин;
- размельчитель тканей (например, марка РТ-2);

⁹⁸ Примечание: допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

⁹⁹ Примечание: допускается использование реактивов с более высокой квалификацией, не требующей дополнительной очистки растворителей

¹⁰⁰ Примечание: допускается использование питательных сред с аналогичными или лучшими характеристиками.

¹⁰¹ Примечание: допускается использование вспомогательного оборудования, устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

- шюттель-аппарат;
- весы технические;
- микроскоп биологический с приспособлением для фазово-контрастного микроскопирования;
- микропипетки;
- размельчитель тканей лабораторный;
- редукторы к баллонам с газом;
- программируемый термоциклер с функцией амплификации (например, MiniAmp Plus (например, англ. Applied Biosystems);
- ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» с УФ-рециркулятором воздуха (например, Lamsystems);
- секвенатор (например, Illumina MiSeq, Illumina; Genolab M, GeneMind Biosciences Co; MGISEq-2000, MGI);
- холодильник с камерами, поддерживающими температуру плюс 2 – 8 °С и минус 18 – 25 °С (например, «Атлант» МХМ-1844-37 КШД);
- набор автоматических пипеток переменного объема (1 – 10 мкл, 10 – 100 мкл, 100 – 1000 мкл) (например, Gilson);
- миницентрифуга-вортекс со сменными роторами (например, настольная центрифуга 5415 R erppendorf, Вортекс-центрифуга Microspin FV-2400);
- ротор для ПЦР-стрипов (например, угловой ротор для ПЦР стрипов 4 – 8 лунок на 0,2 мл (до 6000 об/мин, до 12300 xg) (например, Хеликон);
- роторы для микропробирок объемом 0,2 – 1,5 мл;
- раствор для деконтаминации 0,2 % раствор ДП-2Т, хлорацета или аналогичный (в случае контаминации);
- флуориметр для определения количественного анализа ДНК (например, англ. Qubit 2.0, Invitrogen).

Питательные среды:

- агар желточный для анаэробов;
- агар печеночно-желточный; агар печеночный;
- агар мясо-пептонный;
- агар сахарный кровяной по Цейсслеру;
- бульон триптиказо-пептонно-глюкозный с дрожжевым экстрактом и с трипсином;
- бульон Хоттингера;
- среда Китта-Тароцци с углекислым кальцием;
- среда питательная для контроля стерильности;
- улучшенная клостридиальная среда;
- питательный агар с кровью и глюкозой;
- питательный агар с яичным желтком и лактозой;
- селективная среда для выделения *C. botulinum* из пищевых продуктов с дополнительным внесением циклосерина и сульфадиметоксина и триметоприма;
- селективная среда для выделения *C. botulinum* из пищевых образцов
- анаэробный лецитин – липазный агар;
- среда для определения и культивирования мезофильных и спорообразующих анаэробов;

- модифицированная среда Вильсона-Блера с дополнительным внесением полимикина сульфата и сульфадиазина натрия;
- железосульфитный агар мод. 1. Питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях;
- железосульфитный агар мод. 2. Питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях;
- железосульфитный агар мод. 3. Питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях с дополнительным внесением желточной эмульсии, циклосерина и сульфадиметоксина и триметоприма;
- глюкозо-триптозный агар с циклосерином;
- триптиказо-пептонно-глюкозный дрожжевой бульон;
- триптиказо-пептонно-глюкозный дрожжевой бульон с трипсином;
- триптиказо-пептонно-глюкозный дрожжевой бульон с циклосерином;
- триметоприм – сульфаметоксазол;
- трифторуксусная кислота;
- трипсин, раствор;
- гидролизат казеина ферментативный;
- фломастеры (применяют для метки мышей);
- циклосерин.

Лабораторная посуда:

- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток переменного объема в штативах: до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл, свободные от РНКаз и ДНКаз, стерильные (например, NEST);
- емкость для сброса отработанных расходных материалов;
- пробирки, стрипы или планшеты (в зависимости от количества проб, анализируемых в ходе одного эксперимента), совместимые с моделью термоциклера, из оптически прозрачного пластика для ПЦР;
- пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 и 2 мл;
- штативы для микропробирок объемом 0,6 – 1,5 мл;
- колбы различной емкости (например, 50, 100, 250, 500 и 1000 мл);
- чашки бактериологические Петри, ГОСТ 25336-82;
- шпатели стеклянные и металлические;
- пипетки (например, емкостью 1, 2, 5, 10 мл);
- пробирки бактериологические, ГОСТ 1770-74;
- матрацы стеклянные для субкультуры тканей на 250 и 500 мл;
- банки стеклянные для биопробных мышей;
- клетки для биопробных мышей;
- стеклянные бусы;
- воронки стеклянные;
- колбы Бунзена для фильтрации под вакуумом, ГОСТ 25336-82;
- цилиндры вместимостью 100, 250 и 500 мл;
- мензурки различной вместимости;
- стаканы лабораторные, ГОСТ 25336-82;
- стекла покровные для микропрепаратов;
- стекла предметные для микропрепаратов;

– поплавки для пробирок и колб длиной 20, 45 и 75 мм и диаметром 5, 9, 10 мм;

- пробки разные (резиновые, ватно-марлевые);
- пеналы металлические для пипеток;
- фарфоровые ступки с пестиком;
- петли бактериологические;
- пипетки пастеровские;
- пробирки центрифужные вместимостью 10 – 100 мл;
- магнитный штатив на 96 мест для работы с глубоколоночными планшетами и планшетами для ПЦР с адаптером для работы с одиночными пробирками и стрипами объемом 0,2 мл (например, Хеликон);
- стекла предметные, ГОСТ 9284-75;
- стекла покровные, ГОСТ 6672-75;
- фильтры асбестовые, керамические, мембранные;
- флаконы вместимостью 100 – 500 см³;
- футляры металлические для стерилизации пипеток, чашек Петри, шприцев;

- штативы для пипеток;
- штативы для пробирок;
- бумага индикаторная;
- фильтр тканевый;
- бумага фильтровальная;
- вата;
- шприцы объемом 2 мл;
- контейнеры для утилизации шприцев;
- штативы металлические для пробирок.

Реактивы¹⁰²:

- вода дистиллированная, ГОСТ Р 70152-2022;
- сернокислородное железо;
- углекислый натрий;
- пептон;
- виннокислый калий;
- бриллиантовый зеленый;
- хлористый магний кристаллический;
- хлористый натрий;
- однозамещенный фосфорнокислый калий (безводный);
- дрожжевой экстракт;
- дрожжевой автолизат;
- сыворотка крупного рогатого скота без консерванта;
- раствор трипсина;
- раствор Версена;
- соляная кислота;
- едкий натр;

¹⁰² ОФС 1.3.0001 «Общая фармакопейная статья. Реактивы. Индикаторы», введенная приказом Минздрава России от 20.07.2023 № 377.

- пептон импортный;
- пептон ферментативный, ГОСТ 13805-76;
- натрий кислый селенистокислый (без примеси теллура);
- натрий фосфорнокислый одно- и двузамещенный (безводный);
- набор углеводов;
- дистиллированная вода;
- диметилфенилендиамин;
- альфа-нафтол;
- трифенилтетразолийхлорид (ТТХ);
- агар-агар, ГОСТ 17206-96;
- желчь крупного рогатого скота свежая или сухая обезвоженная;
- калий фосфорнокислый двузамещенный;
- кислота розоловая;
- спирт этиловый ректификованный;
- индикатор кристаллический фиолетовый;
- мембранные фильтры № 2 – 3, планктонные № 6;
- фуксин основной;
- фуксин кислый;
- масло иммерсионное;
- мышцы белые, массой 15 – 20 г, одного пола;
- (α -циано-4-гидроксикоричневая кислота);
- диагностические противоботулинические сыворотки сухие сыворотки типа А; типа В; типа Е; типа С; типа F;
- вода деионизированная, свободная от нуклеаз (например, Евроген);
- 1 × ТЕ буфер (pH 8,0) (например, Евроген);
- полисорбат 20 (Твин 20) (например, англ. DC Fine Chemicals);
- натрия гидроксид (например, англ. AppliChem);
- Tris-HCl буфер (например, Евроген);
- этанол абсолютный, для молекулярной биологии (например, Химмед);
- набор для измерения концентрации ДНК с помощью флуориметра (например, англ. Spectra Q HS, Сесана);
- набор для приготовления ДНК-библиотек, например, англ. Nextera DNA Library Preparation Kit, Illumina;
- набор для приготовления ДНК-библиотек, например, англ. Raissol Bio «SG GM», Сесана;
- набор для приготовления ДНК-библиотек, например, англ. Universal DNA Library Preparation Kit, MGI;
- бриллиантовый зеленый, раствор: 0,5 – 1,0 г бриллиантового зеленого растворяют в 100 мл этилового спирта (применяют для метки белых мышей);
- кальций углекислый стерильный (добавление углекислого кальция к средам с глюкозой способствует образованию спор *C. botulinum*), ГОСТ 10444.1-84;
- кислота аскорбиновая, раствор массовой концентрацией 50 г/л (5 г аскорбиновой кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем дистиллированной водой до метки, растворяют и стерилизуют фильтрованием, используя фильтры со средним диаметром пор 0,40 – 0,45 мкм;

раствор применяют свежеприготовленным; допускается использовать без стерилизации раствор аскорбиновой кислоты для инъекций; применяют в качестве восстановителя, связывающего кислород в питательных средах для *C. botulinum*);

- кислота молочная, L, ГОСТ 490-2006;
- кислота пикриновая, раствор: 2,5 пикриновой кислоты растворяют в 100 мл воды при нагревании;
- кислота соляная ГОСТ 3118-77, раствор с массовой долей соляной кислоты 4 % (применяют для подкисления питательных сред);
- масло вазелиновое¹⁰³ или подсолнечное¹⁰⁴ (масло вазелиновое разливают в колбы по 20 – 50 мл и стерилизуют горячим воздухом в стерилизаторе в течение 60 минут при температуре плюс 140 °С; масло подсолнечное прокалывают при температуре плюс (160±1) °С горячим воздухом в стерилизаторе в течение 2 часов, охлаждают, фасуют в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре плюс (121±1) °С в течение 30 минут);
- мальтоза;
- малахитовый зеленый;
- медь сернокислая¹⁰⁵, 1 % раствор (применяют для постановки биуретовой реакции в питательных средах);
- муравьиная кислота;
- натрия гидроокись¹⁰⁶, раствор с массовой долей гидроокиси натрия 4 % (применяют для подщелачивания питательных сред);
- натрия тиогликолят;
- неомицин;
- спирт этиловый;
- перекись водорода¹⁰⁷, раствор с массовой долей перекиси водорода 3 %;
- растворы фосфатного буфера (для приготовления фосфатного буфера готовят растворы: А – раствор однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4 – квалификации х.ч., дважды перекристаллизованный или для рН-метрии) массовой концентрацией 9,078 г/л; Б – раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ квалификации х.ч., дважды перекристаллизованный) массовой концентрацией 11,876 г/л; для приготовления 100 мл фосфатного буфера: с рН 6,0 – к 12 мл раствора Б добавляют 88 мл раствора А; с рН 6,2 – к 18,5 мл раствора Б добавляют 81,5 мл раствора А;

¹⁰³ ГОСТ 3164-78 «Масло вазелиновое медицинское. Технические условия», введенный постановлением Госстандарта СССР от 24.11.1978 № 3095.

¹⁰⁴ ГОСТ 1129-2013 «Масло подсолнечное. Технические условия», введенный приказом Росстандарта от 28.10.2013 № 1253-ст.

¹⁰⁵ ГОСТ 4165-78 «Реактивы. Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия», введенный постановлением Госстандарта СССР от 23.02.1978 № 530.

¹⁰⁶ ГОСТ 4328-77 «Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия», введенный постановлением Государственного комитета стандартов Совета министров СССР от 17.06.1977 № 1514.

¹⁰⁷ ГОСТ 177-88 «Водорода перекись. Технические условия», введенный постановлением Госстандарта СССР от 29.06.1988 № 2417.

с рН 6,8 – к 50 мл раствора Б добавляют 50 мл раствора А; раствор фосфатного буфера с рН 6,0 применяют для растворения трипсина);

– растворы желатино-фосфатного буфера (в 100 мл фосфатного буферного раствора с определенным значением рН вносят 0,6 г желатина, дают набухнуть желатину и нагревают до полного растворения желатина. Стерилизуют при температуре плюс (110 ± 1) °С в течение 15 минут; раствор желатино-фосфатного буфера с рН 6,2 применяют в качестве стабилизатора ботулинических токсинов. В случае выявления ботулинического токсина типа А переходят на раствор желатино-фосфатного буфера с рН 6,8);

– смесь реактивов для создания анаэробных условий¹⁰⁸. Допускается использование талька вместо инфузорной земли;

– УИХЭ-1 для индикации методом ИХА различных возбудителей, а также ботулинического токсина типа А и типа В в смывах с поверхностей объектов окружающей среды 304.00.00.000-01;

– МИУ для выявления методом ИХА токсинов (ботулинические токсины типов А и В, стафилококковый энтеротоксин В, холерный экзотоксин, рицин);

– комплект «Экспресс-комплект-Био» (далее – ЭкБ) для индикации методом ИХА, например, различных антигенов некоторых вирусов, вегетативных и споровых форм бактерий, бактериальных и растительных токсинов, в частности ботулинического токсина типа А, ботулинического токсина типа В;

– набор для ИФА для выявления ботулотоксина типа А (например, Human Botulinum Toxin A (BTA) ELISA kit, BlueGene);

– для экстракции ДНК из штаммов микроорганизмов используют сертифицированные коммерческие наборы, например, набор реагентов серии «ДНК-экстран», М-Сорб_ООМ»; например, наборы «ДНК-сорб В», «Рибо-сорб», «РИБО-преп».

Одноразовое оборудование и материалы могут использоваться вместо оборудования и материалов многократного использования (например, стеклянной посуды, чашек Петри, пипеток, бутылок, пробирок, петель, шпателей), если они аналогичны по техническим условиям. Необходимо проверить, чтобы такое оборудование подходило для использования в микробиологии.

¹⁰⁸ ГОСТ 10444.1-84.

НОРМАТИВНЫЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
3. Федеральный закон от 31.07.2020 № 248-ФЗ «О государственном контроле (надзоре) и муниципальном контроле в Российской Федерации».
4. Федеральный закон от 29.06.2015 № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации».
5. Федеральный закон от 02.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».
6. Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях от 30.12.2001 № 195-ФЗ.
7. Положение о лицензировании деятельности по оказанию услуг по дезинфекции, дезинсекции и дератизации в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.
8. Постановление Правительства Российской Федерации от 30.06.2021 № 1100 «О федеральном государственном санитарно-эпидемиологическом контроле (надзоре)».
9. Постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».
10. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011).
11. Технический регламент Таможенного союза «Пищевая продукция в части ее маркировки» (ТР ТС 022/2011).
12. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» (ТР ТС 034/2013).
13. Решение Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 № 299 «О применении санитарных мер в Евразийском экономическом союзе».
14. Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 31.07.2018 № 13 «Об отборе образцов (проб) для проведения исследований (испытаний) и измерений пищевой продукции при применении и исполнении требований технических регламентов Евразийского экономического союза».
15. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
16. СанПиН 2.3/2.4.3590-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации общественного питания населения».
17. СП 2.3.6.3668-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям деятельности торговых объектов и рынков, реализующих пищевую продукцию».
18. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера».

19. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 21.10.2010 № 133 «Об оптимизации противоэпидемической работы и утверждении формы акта эпидемиологического расследования очага инфекционной (паразитарной) болезни с установлением причинно-следственной связи».

20. Приказ Минздрава России от 18.05.2021 № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований».

21. Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

22. Приказ Минздрава России от 29.06.2000 № 229 «О профессиональной гигиенической подготовке и аттестации должностных лиц и работников организаций».

23. МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности».

24. МР 3.5.0353-24 «Методические рекомендации по организации санитарной обработки помещений, оборудования и инвентаря на предприятиях пищевой промышленности».

25. МР 5.1.0116-17 «Риск-ориентированная модель контрольно-надзорной деятельности в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия. Классификация хозяйствующих субъектов, видов деятельности и объектов надзора по потенциальному риску причинения вреда здоровью человека для организации плановых контрольно-надзорных мероприятий».

26. МР 5.1.0096-14. «Методические подходы к организации оценки процессов производства (изготовления) пищевой продукции на основе принципов ХАССП».

27. МУ 1.3.2569-09. «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

28. МУ 3.1.3114/1-13. «Организация работы в очагах инфекционных и паразитарных болезней».

29. МУК 4.2.2316-08 Методы контроля. биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред.

30. ГОСТ 10444.7-86. Продукты пищевые. Методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*.

31. ГОСТ Р 59778-2021 «Процедуры взятия проб венозной и капиллярной крови для лабораторных исследований».

32. ГОСТ 31904-2012 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний».

33. ГОСТ 7702.2.0-2016 «Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям».

34. ГОСТ 10444.7-86 «Продукты пищевые. Методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*».
35. ГОСТ 17.4.4.02-2017 «Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа».
36. ГОСТ Р 70393-2022 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Приготовление, производство, хранение и испытания питательных сред».
37. ГОСТ ISO 11133-2016. «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред».
38. ГОСТ 26670-91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов».
39. ГОСТ 10444.1-84 «Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».
40. ГОСТ 25706-83 «Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования».
41. ГОСТ 25336-82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».
42. ГОСТ 1770-74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия».
43. ГОСТ 9284-75 «Стеклянные предметные для микропрепаратов. Технические условия».
44. ГОСТ 6672-75 «Стеклянные покровные для микропрепаратов. Технические условия».
45. ГОСТ Р 70152-2022 «Качество воды. Методы внутреннего лабораторного контроля качества проведения микробиологических и паразитологических исследований».
46. ГОСТ 17206-96. «Агар микробиологический. Технические условия».
47. ГОСТ 490-2006. «Добавки пищевые. Кислота молочная E270. Технические условия».
48. ГОСТ 3118-77 «Кислота соляная. Технические условия».
49. ГОСТ 3164-78 «Масло вазелиновое медицинское. Технические условия».
50. ГОСТ 1129-2013 «Масло подсолнечное. Технические условия».
51. ГОСТ 4165-78 «Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия».
52. ГОСТ 4328-77 «Натрия гидроокись. Технические условия».
53. ГОСТ 177-88 «Водорода перекись. Технические условия».
54. ГОСТ 31904-2012 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний».
55. Общая фармакопейная статья «Реактивы. Индикаторы. ОФС.1.3.0001». Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания.
56. Клинические рекомендации «Ботулизм у детей - 2024-2025-2026», утвержденные Минздравом Российской Федерации 30.09.2024.
57. Клинические рекомендации – «Ботулизм у взрослых – 2025-2026-2027», утвержденные Минздравом Российской Федерации 16.05.2025.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Мицевич И.П., Карцев Н.Н., Канащенко М.Е., Ерусланов Б.В., Асташкин Е.И., Детушев К.В., Борзилов А.И., Коробова О.В., Фурсова Н.К., Храмов М.В. Выделение *Clostridium botulinum* при эпидемиологическом обследовании в одном из регионов России // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019. Т. 21. С. 47–59.
2. Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К. Ботулизм: характеристика возбудителя и лабораторные методы его диагностики // Коллективная монография «Микробиологический контроль качества пищевой продукции». 2020. С. 159-180.
3. Dong M., Stenmark P. The Structure and Classification of Botulinum Toxins. In Handbook of Experimental Pharmacology // Springer: Berlin/Heidelberg. Germany. 2019. P. 1–23.
4. Tehran D.A., Pirazzini M. Novel botulinum neurotoxins: Exploring underneath the iceberg tip // Toxins. 2018. 10. P. 190.
5. Peck M.W., Smith T.J., Anniballi F., Austin J.W., Bano L., Bradshaw M., Cuervo P., Cheng L.W., Derman Y., Dorner B.G. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature // Toxins. 2017. 9. P. 38.
6. Brunt J., van Vliet A.H.M., Stringer S.C., Carter A.T., Lindström M. Peck M.W. Pan-Genomic Analysis of *Clostridium botulinum* group II (Non-Proteolytic *C. botulinum*) associated with foodborne botulism and isolated from the environment // Toxins. 2020. 12. P. 306.
7. Rasetti-Escargueil C., Lemichez E., Popoff M.R. Variability of botulinum toxins: Challenges and opportunities for the future // Toxins. 2018. 10. P. 374.
8. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000-2019. Global Health Estimates Technical Paper WHO/ DDI/DNA/GHE/2020.3. Geneva: World Health Organisation, 2020. 47.
9. Численность населения Российской Федерации по муниципальным образованиям на 1 января 2024 года. Федеральная служба государственной статистики.