**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации**

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах

**Методические указания**
**МУК 4.2.2429—08**

Издание официальное

**Москва • 2009**

gost.e-ecolog.ru

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах

**Методические указания**
**МУК 4.2.2429—08**

ББК 51.23
М54

М54 **Метод** определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—18 с.

ISBN 5—7508—0762—2

1. Разработаны ГУ Научно-исследовательский институт питания РАМН (В. А. Тутельян, С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина); ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН (А. Л. Гинцбург, Ф. С. Флуер).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 29 октября 2008 г.

4. Введены в действие с 15 декабря 2008 г.

5. Введены впервые.

**ББК 51.23**

ISBN 5—7508—0762—2

**© Роспотребнадзор, 2009**
**© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009**

## Содержание

1. Область применения ..... 4
2. Определения, обозначения и сокращения ..... 5
3. Сущность метода ..... 5
4. Требования к выполнению анализов ..... 6
4.1. Условия безопасного проведения работ ..... 6
4.2. Требования к квалификации специалистов ..... 7
4.3. Условия выполнения измерений ..... 7
5. Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы ..... 7
5.1. Средства измерений и вспомогательное оборудование ..... 7
5.2. Лабораторная посуда и инструменты ..... 8
5.3. Реактивы и материалы ..... 8
5.4. Состав тест-систем для определения стафилококковых энтеротоксинов типов А и В ..... 9
5.5. Состав набора реагентов для иммуноферментного определения стафилококковых энтеротоксинов А, В, С, D, Е ..... 10
6. Подготовка к выполнению анализа ..... 10
6.1.Отбор проб ..... 10
6.2. Подготовка проб к анализу (при раздельном определении СЭА и СЭВ) ..... 11
6.3. Подготовка лабораторной посуды ..... 12
6.4. Подготовка прибора к работе ..... 12
6.5. Проведение анализа при использовании тест-систем для определения стафилококковых энтеротоксинов типов А и В ..... 12
6.6. Проведение анализа при совместном определении стафилококковых энтеротоксинов А, В, С, D, Е ..... 15
6.7. Проведение анализа ..... 16
6.8. Обработка результатов измерения ..... 17
6.9. Учет результатов анализа ..... 18
*Приложение.* Форма таблицы для записи результатов анализа ..... 18

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
29 октября 2008 г.
Дата введения: 15 декабря 2008 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах

## Методические указания
## МУК 4.2.2429—08

## 1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают метод качественного определения стафилококковых энтеротоксинов в продовольственном сырье и пищевых продуктах животного происхождения (в молоке, молочных продуктах и сырах, мясе и мясопродуктах; птице и птицепродуктах) на основе твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Методические указания предназначены для органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также могут быть использованы для проведения производственного контроля другими испытательными лабораториями, аккредитованными в порядке, установленном Правительством Российской Федерации.

1.3. Методы предназначены для исследования пищевых продуктов при осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора и контроля, а также при санитарно-эпидемиологическом расследовании вспышек пищевых отравлений и инфекций с пищевым путем передачи.

1.4. Согласно настоящим методическим указаниям предел обнаружения стафилококковых энтеротоксинов соответствует диапазону мас-

совых концентраций от 0,2 до 2,0 мкг/кг (в зависимости от типа токсина и вида продукта), что ниже уровня 100—200 нг наиболее распространенного из числа известных иммунологических типов стафилококкового энтеротоксина типа А, обусловливающего развитие стафилотоксикоза у человека.

## 2. Определения, обозначения и сокращения

*СЭТ* – стафилококковые энтеротоксины.

*СЭА* – стафилококковый энтеротоксин типа А.

*СЭВ* – стафилококковый энтеротоксин типа В.

*ИФА* – иммуноферментный анализ.

*ИГ, IgG* – иммуноглобулины.

*Кг* – конъюгат.

*ОП* – оптическая плотность.

*Стандартный образец состава* – стандартный образец, воспроизводящий значения величин, характеризующих содержание определенных компонентов (ГОСТ 8.315).

*Калибровочный раствор* – раствор компонента, приготовленный из стандартного образца состава и необходимый для проведения испытания.

## 3. Сущность метода

3.1. Метод основан на детекции СЭТ, продуцируемых *Staphylococcus aureus* и другими коагулазоположительными стафилококками, в подготовленной соответствующим образом пробе пищевого продукта путем постановки иммунохимических тестов непрямого твердофазного иммуноферментного анализа, позволяющего обнаруживать эпидзначимые типы стафилококковых энтеротоксинов А (СЭА) или В (СЭВ) при раздельном определении (тест-системы по ВФС 42-235 и 42-236, ВС 89), а также энтеротоксины типов А, В, С, D и Е при совместном определении (набор реагентов RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E).

3.2. Принцип метода. Определение СЭТ происходит за счет специфического взаимодействия стафилококковых иммуноглобулинов к различным типам СЭТ, адсорбированных на планшете, со стафилококковыми энтеротоксинами, содержащимися в исследуемом материале. Образовавшийся комплекс «антитело + антиген» выявляют с помощью конкурирующих стафилококковых иммуноглобулинов (конъюгатов), меченых пероксидазой. Образующийся аналитический сигнал, зависящий от результатов взаимодействия комплекса «антитело + антиген» с конъюгатом на поверхности ячеек планшета и выражающийся в ферментации

субстрата – ортофенилендиамина (при раздельном определении СЭТ типов А и В) или тетраметилбензидина (при совместном определении СЭТ типов А, В, С, D и Е) с изменением его окраски, измеряется по регистрируемому значению оптической плотности при длинах волн 492 и 450 нм, соответственно. Схема анализа представлена в табл. 1

Таблица 1

**Схема анализа**

| ***Последовательность этапов ИФА при определении стафилококковых энтеротоксинов*** |
|---|
| Отбор, подготовка проб и экстракция СЭА и СЭВ |
| Сенсибилизация планшетов иммуноглобулинами |
| Отмывка планшетов от непрореагировавших иммуноглобулинов |
| Взаимодействие иммуноглобулинов с антигеном (СЭА или СЭВ) |
| Отмывка планшетов от непрореагировавшего антигена |
| Взаимодействие комплекса «антиген–антитело» с конъюгатом |
| Отмывка планшетов от непрореагировавшего конъюгата |
| Внесение субстрата |
| Учет результатов |

3.3. Для проведения раздельного определения используются тест-системы иммуноферментные для определения стафилококковых энтеротоксинов типов А и В в виде лиофилизированных компонентов.

3.4. Для проведения совместного определения СЭТ используются тест-системы иммуноферментные для одновременного определения стафилококковых энтеротоксинов типов А, В, С, D, Е с использованием набора реагентов RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E или других зарегистрированных в Российской Федерации в установленном порядке тест-систем иммуноферментных с аналогичными характеристиками.

## 4. Требования к выполнению анализов

### *4.1. Условия безопасного проведения работ*

При выполнении анализов необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.018 и электробезопасности по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на фотометр, сушильный шкаф, центрифуги.

Для инактивации растворов, содержащих стафилококковые энтеротоксины, используют 6 %-й раствор перекиси водорода.

### *4.2. Требования к квалификации специалистов*

Выполнение измерений может проводить специалист, способный после освоения техники иммуноферментного анализа и приемов по эксплуатации аппаратуры получать результаты в пределах нормативов оперативного контроля погрешности.

### *4.3. Условия выполнения измерений*

Измерения проводятся в нормальных лабораторных условиях:

- температура окружающего воздуха (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность (65 ± 15) %.

## 5. Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

### *5.1. Средства измерений и вспомогательное оборудование*

| | |
|---|---|
| Фотометр вертикального типа с диапазоном измерения оптической плотности 0,0—2,5 в комплекте с интерференционным светофильтром для длин волн 490—492 нм и 450 нм | |
| Центрифуга лабораторная | |
| Шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий постоянство температуры (130 ± 5) °С по НД | |
| Шкаф холодильный любого типа, обеспечивающий постоянство температуры по НД | |
| Весы лабораторные аналитические общего назначения и образцовые с наибольшим пределом взвешивания 200 г, не ниже 2-го класса точности | ГОСТ 24104—88 |
| Дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 20—200 мкл, 200—1 000 мкл и дискретности установки доз 5 мкл | ТУ 64-16-55—90 |
| Дистиллятор типа ДЭ-4-2 по НД | |
| pH-метр по НД | |
| Гомогенизатор ножевой или перистальтический типа «Стомайкер» | |
| Ступки фарфоровые с пестиками | |

Допускается использование оборудования, приборов и средств измерений, закупаемых по импорту, зарегистрированных в Госреестре РФ, соответствующих перечисленным по техническим характеристикам и позволяющих воспроизводить метрологические характеристики, указанные в настоящих методических указаниях.

### *5.2 Лабораторная посуда и инструменты*

| | |
|---|---|
| Посуда мерная лабораторная: цилиндры исполнения 2, вместимостью 1 000 $см^3$; цилиндры исполнения 3, вместимостью 25 и 100 $см^3$; пробирки исполнения 1, вместимостью 10 $см^3$; колбы исполнения 2, вместимостью 100, 500 и 1 000 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |
| Пипетки 2-1-50 или 2-2-50 | ГОСТ 20292—74 |
| Посуда лабораторная стеклянная: колбы конические, вместимостью 50—1 000 $см^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Пинцеты, скальпели, ножницы | |
| Стерильные фильтр-насадки на шприц, диаметр пор 0,2 мкм (типа Millipore low protein binding Millex-GV-filters) | |
| Автоматические пипетки на 50, 100 мкл и 1 мл, с наконечниками | |

### *5.3. Реактивы и материалы*

| | |
|---|---|
| Бычий сывороточный альбумин по НД | ТУ 6-09-10-342—75 |
| Тест-система иммуноферментная для определения стафилококкового энтеротоксина типа А по ВФС 42-235, ВС 89 с чувствительностью 2 $нг/см^3$ | |
| Тест-система иммуноферментная для определения стафилококкового энтеротоксина типа В по ВФС 42-236, ВС 89 с чувствительностью 1 $нг/см^3$ | |
| Спирт этиловый ректифицированный | ГОСТ 11547—80 |
| Кислота серная концентрированная, хч | ГОСТ 4204—77 |
| Вода дистиллированная | ГОСТ 6709—72 |
| Водорода перекись, хч | ГОСТ 109929—76 |
| О-фенилендиамин по НД | |
| Калий хлористый | ГОСТ 4234—64 |
| Натрий углекислый | ГОСТ 84—76 |
| или натрий углекислый безводный | ГОСТ 83—79 |

| | |
|---|---|
| Натрий двууглекислый | ГОСТ 2156—76 |
| Натрий хлористый | ГОСТ 4233—77 |
| Натрий гидроокись | |
| ТРИС-буфер | |
| Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный 12-водный | ГОСТ 4172—76 |
| Калий фосфорно-кислый однозамещенный | ГОСТ 4198—75 |
| Твин-20 по НД | |
| Кислота лимонная 1-водная | ГОСТ 3652—69 |
| Наборы реагентов для иммуноферментного определения стафилококковых энтеротоксинов RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (ф. «R-Biopharm AG», Германия) | |
| н-гептан | |
| Фосфатный (PBS) буфер, pH 7,4 (0,55 г $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ + 2,85 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + + 8,7 г NaCl растворить в дистиллированной воде и довести до объема 1 000 мл) | |

### *5.4. Состав тест-систем для определения стафилококковых энтеротоксинов типов А и В*

Тест-система иммуноферментная для определения стафилококковых энтеротоксинов типов А и В представляет собой следующие наборы:

1) иммуноглобулины к стафилококковому энтеротоксину, выделенные из сыворотки крови (кроличьей), сухие (ИГ) в ампулах;

2) иммуноглобулины к стафилококковому энтеротоксину, выделенные из сыворотки крови (кроличьей), ковалентно связанные с пероксидазой хрена, сухие, конъюгат (Кг) в ампулах;

3) стафилококковый энтеротоксин (СЭ) ампулированный;

4) о-фенилендиамин (ОФД) сухой;

5) Твин-20 или тритон Х-100 (жидкий);

6) бычий сывороточный альбумин (БСА);

7) смесь солей для приготовления карбонат-бикарбонатного буферного раствора (КББР), раствор № 1;

8) смесь солей для приготовления фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБР), раствор № 2;

9) смесь солей для приготовления цитратно-фосфатного буферного раствора (ЦФБР), раствор № 3;

10) планшеты для иммуноферментного анализа (ИФА), однократного применения;

11) гидроперит в таблетках;

12) планшет 96-ячеечный полистироловый наборный по НД.

Тест-системы из сухих реагентов хранят в защищенном от света месте при температуре (6 ± 2) °С.

Срок годности при условии соблюдения правил хранения – 2 года с момента выпуска.

В случае несоответствия используемых наборов требованиям специфичности и снижения активности биологических компонентов применение наборов данной серии прекращают.

### *5.5. Состав набора реагентов для иммуноферментного определения стафилококковых энтеротоксинов A, B, C, D, E*

В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для исследования 12 проб с идентификацией энтеротоксинов (включая положительный контроль).

Набор содержит:

- микротитровальный планшет (12 х 8), 96 лунок, сенсибилизированных специфическими антителами к энтеротоксинам стафилококка (SET) — 1 шт.;
- положительный контроль, готовый к использованию, содержит энтеротоксины стафилококка A, B, C, D, E, по 2 нг/мл каждого токсина, 1,25 мл — 1 шт.;
- коньюгат антител к SET с пероксидазой хрена, готовый к использованию, 11 мл: красная крышка — 1 шт.;
- субстрат, содержит пероксид карбамида, 7 мл: зеленая крышка — 1 шт.;
- хромоген, содержит тетраметилбензидин, 7 мл: голубая крышка — 1 шт.;
- стоп-реагент, содержит 1 N серную кислоту, 14 мл: желтая крышка — 1 шт.;
- моющий буфер, pH 7,2, концентрат, 10 х, 100 мл: коричневая крышка — 1 шт.

## 6. Подготовка к выполнению анализа

### *6.1. Отбор проб*

Отбор проб для анализа следует проводить в соответствии с ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для

микробиологических анализов», ГОСТ Р 51446—99 (ИСО 7218—96) «Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований» или МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов».

### *6.2. Подготовка проб к анализу (при раздельном определении СЭА и СЭВ)*

Из асептично отобранных образцов пищевых продуктов готовят пробы к анализу и экстрагируют СЭТ, учитывая физическое состояние продуктов, следующим образом:

а) экстракция СЭТ из твердых продуктов. Из произвольно отобранных точечных проб из 5 мест партии, массой нетто 25 г каждая, готовят среднюю пробу массой 125 г, измельчают режущим инструментом, добавляют 125 $см^3$ стерильного забуференного физиологического раствора с pH 7,4, содержащего 8,5 г натрия хлорида, 0,55 г $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ и 2,85 г $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ на 1 000 мл дистиллированной воды, и гомогенизируют до получения однородной массы. В полученном гомогенате с помощью 1 N раствора соляной кислоты устанавливают pH 4,5, затем центрифугируют гомогенат при 8 000—9 000 об./мин в течение 45 мин при охлаждении (допускается проводить центрифугирование при температуре не выше 15 °С). После центрифугирования слой жира, собирающийся на поверхности надосадочной жидкости, удаляют шпателем или стеклянной палочкой.

После удаления жира надосадочную жидкость (не менее 5 $см^3$) переносят в новую стерильную пробирку, устанавливают в ней pH 7,3 ± 0,1 при помощи 1 N раствора NaOH, осадок удаляют. К полученному таким образом экстракту добавляют Твин-20 до конечной концентрации 0,1 % и бычий сывороточный альбумин (или нормальную кроличью сыворотку) до конечной концентрации 2,5 % и выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин;

б) экстракция СЭТ из сыров. Из произвольно отобранных точечных проб сыра из 5 мест от партии, массой нетто 25 г каждая, готовят среднюю пробу массой 125 г, измельчают режущим инструментом, добавляют 125 $см^3$ стерильного 0,25 М ТРИС-буфера с pH 8,0, содержащего 30,28 г ТРИС гидроксиметиламинометана на 1 000 мл дистиллированной воды, и гомогенизируют до получения однородной массы в течение 3 мин при высокой скорости. Доводят pH до 4,0 с помощью 6 N раствора соляной кислоты. Гомогенат центрифугируют в течение 10 мин при

3 500 g, отделяют супернатант (не менее 5 $см^3$) и доводят в нем pH до 7,0—8,0 6 N раствором NaOH;

в) экстракция СЭТ из жидких продуктов и сухих молочных продуктов. В объединенной пробе молока объемом 125 $см^3$ с помощью 1 N раствора соляной кислоты устанавливают pH 4,5, затем центрифугируют образец при 8 000—9 000 об./мин в течение 45 мин при охлаждении. В надосадочной жидкости (не менее 5 $см^3$) доводят pH до 7,0—8,0 6 N раствором NaOH.

Образец сухого молока (25 г) смешивают с 125 $см^3$ 0,25 М ТРИС-буфера с pH 8,0 и гомогенизируют до получения однородной массы в течение 3 мин при высокой скорости. Доводят pH до 4,0 с помощью 6 N раствора соляной кислоты. Гомогенат центрифугируют в течение 10 мин при 3 500 g, отделяют супернатант (не менее 5 $см^3$) и доводят в нем pH до 7,0—8,0 6 N раствором NaOH.

### *6.3. Подготовка лабораторной посуды*

Лабораторную стеклянную посуду следует мыть хромовой смесью, многократно промывать водопроводной водой и ополаскивать дистиллированной водой. Сушить посуду следует в сушильном шкафу.

### *6.4. Подготовка прибора к работе*

Подготовку и проверку фотометра проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническим описанием к прибору.

### *6.5. Проведение анализа при использовании тест-систем для определения стафилококковых энтеротоксинов типов А и В*

#### 6.5.1. Подготовка к проведению анализа

6.5.1.1. *Раствор № 1.* Карбонатно-бикарбонатный буферный раствор (КББР) 0,05 М, pH 9,5 ± 0,1. Навеску солей из пакета с надписью «раствор № 1» разводят в 150 $см^3$ дистиллированной воды. Хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение месяца.

6.5.1.2. *Раствор № 2.* Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР) 0,1 М, pH 7,2 ± 0,1. Навеску солей из пакета с надписью «раствор № 2» растворяют в 500 $см^3$ дистиллированной воды и доводят объем до 3 $дм^3$. Хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение месяца.

6.5.1.3. *Раствор № 2А.* К 1 $дм^3$ раствора № 2 добавляют 0,5 $см^3$ детергента (Твин-20 или тритон Х-100). Раствор № 2А хранению не подлежит.

6.5.1.4. *Раствор № 2Б.* Содержимое флакона с этикеткой «БСА» растворяют в 50 $см^3$ раствора № 2А. Хранению не подлежит.

6.5.1.5. *Раствор № 3.* ЦФБР 0,1 М, pH 5,5 ± 0,1. Содержимое пакетика с надписью «лимонная кислота» (пакет № 3) 0,32 г растворяют в 25 $см^3$ дистиллированной воды. Содержимое пакета с надписью «натрий фосфорно-кислый 12-водный» 1,65 г также растворяют в 25 $см^3$ дистиллированной воды. Хранить по отдельности, не более двух недель. Перед употреблением растворы смешивают в соотношении 1 : 1.

6.5.1.6. *Раствор № 4.* Содержимое 1 ампулы с этикеткой «ИГ» растворяют в 1 $см^3$ дистиллированной воды, далее доводят объем до 30 $см^3$ раствором № 1. Одна ампула «ИГ» расходуется на 1 планшет.

6.5.1.7. *Раствор № 5.* Содержимое 1 ампулы с этикеткой «СЭА» или «СЭВ» растворяют в 1 $см^3$ дистиллированной воды. Исходный раствор СЭА и СЭВ можно хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 1 месяца. Рабочий раствор СЭА и СЭВ с конечной концентрацией 1 нг/ $см^3$ готовят из исходного, используя раствор № 2А. Хранению не подлежит.

6.5.1.8. *Раствор № 6.* Содержимое ампулы с этикеткой «Кг» разводят в 1 $см^3$ дистиллированной воды, далее доводят до 10 $см^3$ раствором № 2Б. Хранению не подлежит.

6.5.1.9. *Раствор № 7.* Растворяют 4—5 мг ОФД в 10 $см^3$ раствора № 3. Раствор № 7 готовят за 10 мин до использования, хранят в темном месте при комнатной температуре. (Содержимое флакона ОФД рассчитано на 50 $см^3$, т. е. на 5 планшетов.)

6.5.1.10. *Раствор № 8.* Одну таблетку гидроперита растворяют в 10 $см^3$ дистиллированной воды. Полученный 30 %-й раствор перекиси водорода хранят в темном месте при температуре (4 ± 2) °С. Срок хранения 1 месяц.

6.5.1.11. *Раствор № 9.* Смешивают 10 $см^3$ раствора № 7 и 0,17 $см^3$ раствора № 8, разведенного дистиллированной водой 1 : 10 (или 50 $см^3$ раствора № 7 и 0,85 $см^3$ 3 %-го раствора перекиси водорода). Готовят непосредственно перед внесением в лунки. Хранению не подлежит.

6.5.1.12. *Раствор № 10.* Раствор серной кислоты в концентрации 1,5 моль/$дм^3$ – растворяют 1,5 $см^3$ концентрированной (хч) серной кислоты в 15 $см^3$ дистиллированной воды. Хранят при температуре (20 ± 2) °С.

**6.5.2. Подготовка проб к измерениям**

Приготовление рабочих растворов исследуемых образцов.

Экстракты из проб продуктов, полученные по п. 6.2, вносят в количестве 1,0 $см^3$ в пробирки и наносят маркировку, соответствующую номерам проб.

**6.5.3. Проведение испытаний**

6.5.3.1. Сорбция стафилококковых иммуноглобулинов на планшет. В ячейки планшета вносят с помощью автоматического дозатора пипеточного по 0,25 $см^3$ раствора № 4. Сенсибилизацию планшетов иммуноглобулинами проводят в течение 2 ч при температуре (37 ± 2) °С или 18—24 ч при температуре (4 ± 2) °С.

6.5.3.2. По окончании сорбции иммуноглобулины удаляют из ячеек планшета сильным встряхиванием перевернутого планшета и отмывают 4 раза по 5 мин раствором № 2А (промывной раствор вносят до края ячеек), вытряхивают и высушивают постукиванием по фильтровальной бумаге.

6.5.3.3. Внесение на планшет положительного контроля. В ячейки А-1, В-1, вносят по 0,1 $см^3$ раствора № 5 (положительный контроль). В ячейки С-1, Д-1, вносят по 0,1 $см^3$ раствора № 2 А (отрицательный контроль). В остальные ячейки планшета вносят по 0,1 $см^3$ исследуемого материала.

6.5.3.4. Планшеты выдерживают в термостате при температуре (37 ± 2) °С в течение 1 ч, затем жидкость из ячеек удаляют в емкость с 6 %-м раствором перекиси водорода, отмывают 5 раз и подсушивают, как указано в п. 6.5.3.2.

6.5.3.5. В каждую ячейку планшета вносят по 0,1 $см^3$ раствора № 6.

6.5.3.6. Планшеты выдерживают в термостате при температуре (37 ± 2 ) °С в течение 1 ч.

6.5.3.7. Удаляют жидкость из ячеек планшета встряхиванием и отмывают 6 раз как указано в п. 6.5.3.2.

6.5.3.8. В каждую ячейку планшета вносят по 0,1 $см^3$ раствора № 9.

6.5.3.9. Планшеты выдерживают в темноте при температуре (20 ± 2) °С в течение 30 мин до появления слабо-желтой окраски в контрольных ячейках (С-1, Д-1).

6.5.3.10. Реакцию останавливают внесением в ячейки по 0,1 $см^3$ раствора № 10. В ячейках, где прошла реакция, появляется окрашивание от желтого до оранжево-коричневого. В ячейках, где исследуемые пробы не содержат энтеротоксина, окраска отсутствует или светло-желтая.

6.5.3.11. Для каждого типа энтеротоксина следует использовать отдельный планшет, повторное использование планшета не допускается.

### 6.5.4. Учет результатов анализа

6.5.4.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности (ОП) на вертикальном фотометре при длине волны 492 нм.

Результаты записей оптической плотности переносят в таблицу и располагают в соответствии с номерами вариантов.

6.5.4.2. Величина оптической плотности в ячейках с положительным контролем – специфическим антигеном (А-1, В-1) – должна составлять не менее 0,30 ± 0,05; в ячейках с отрицательным контролем (С-1, Д-1) – не более 0,10 ± 0,05. Значения ОП в двух параллельных определениях одной и той же пробы не должны различаться более чем на 0,05.

6.5.4.3. Для всех ячеек-дублей рассчитывают средние арифметические значения оптической плотности (ОП) и находят отношения полученных к среднему значению оптической плотности для контроля.

6.5.4.4. Результат определения считается положительным, если ОП в исследуемом материале в 2 раза и более превосходит среднее арифметическое из двух значений ОП отрицательного контроля.

6.5.4.5. По результатам двух параллельных определений рассчитывают среднее арифметическое значение ОП в исследуемом образце.

Если расхождение между параллельными определениями не превышает допустимого, то среднее арифметическое принимают за результат анализа. В противном случае анализ следует повторить.

6.5.4.6. В протоколах анализа по раздельному определению СЭТ результаты представляют в виде:

- СЭА или СЭВ обнаружены в образце массой 125 г (в 5 образцах по 25 г);
- СЭА или СЭВ не обнаружены в образце массой 125 г (в 5 образцах по 25 г).

### *6.6. Проведение анализа при совместном определении стафилококковых энтеротоксинов A, B, C, D, E*

Перед использованием набора необходимо довести температуру всех реагентов до комнатной, сразу после использования охладить все реагенты до температуры 2—8 °С. В процессе выполнения анализа не допускать высыхания лунок планшета. Воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. На всех стадиях инкубации следует

избегать воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет крышкой.

6.6.1. Приготовление моющего буфера. Для приготовления моющего буфера смешивают 1 часть концентрированного моющего буфера и 9 частей дистиллированной воды (например, 10 мл концентрата и 90 мл дистиллированной воды). Если во флаконе с концентрированным буфером образовались кристаллы, следует предварительно их растворить, нагревая флакон в водяной бане при 37 °С. Срок хранения готового моющего буфера при температуре 2—8 °С составляет не более четырех недель. Температуру моющего буфера перед его использованием необходимо довести до комнатной.

6.6.2. Подготовка планшета. Фольгированная упаковка планшета открывается со стороны застежки. Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов вместе с рамкой. Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2—8 °С.

6.6.3. Положительный контроль. В качестве положительного контроля используют смесь энтеротоксинов A, B, C, D, E (концентрация каждого энтеротоксина составляет 2 нг/мл), раствор входит в комплект набора в готовом к использованию виде.

### *6.7. Проведение анализа*

6.7.1. Вставить в рамку планшета стрипы в количестве, соответствующем числу проб, подготовленных для анализа.

6.7.2. Добавить по 100 мкл исследуемого раствора в лунки A—G соответствующего стрипа, в лунку H добавить 100 мкл положительного контроля, осторожно перемешать вручную и оставить на инкубацию в течение одного часа при комнатной температуре.

6.7.3. Вылить жидкость из лунок, перевернуть рамку и тщательно выбить капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. С помощью 8-канальной пипетки заполнить лунки готовым моющим буфером по 250 мкл и снова вылить жидкость. Выбить лунки, как описано выше. Повторить процедуру промывки лунок моющим буфером еще три раза.

6.7.4. Добавить в каждую лунку по 100 мкл конъюгата, осторожно перемешать вручную и оставить на инкубацию в течение одного часа при комнатной температуре.

6.7.5. Вылить жидкость из лунок, перевернуть рамку и тщательно выбить капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. С помощью 8-канальной пипетки заполнить лунки готовым моющим буфером по 250 мкл и снова вылить жидкость. Выбить лунки, как описано выше. Повторить процедуру промывки лунок моющим буфером еще три раза.

6.7.6. Добавить по 50 мкл субстрата и хромогена в каждую лунку. Осторожно перемешать вручную и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте.

6.7.7. Добавить в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и осторожно перемешать вручную. В течение 30 мин после добавления стоп-реагента измерить оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм («бланк» или нулевое считывание по воздуху).

### *6.8. Обработка результатов измерения*

6.8.1. Определение пороговой величины. Для каждой пробы отдельно вычисляется среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках F и G (отрицательный контроль). Для того, чтобы получить пороговую величину, к этому среднему значению следует добавить 0,15.

**Пример:**

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

6.8.2. Область достоверности (контроль качества анализа):

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

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

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

6.8.3. Интерпретация результатов. Результат интерпретируется как отрицательный, если величина оптической плотности ниже пороговой. Результат интерпретируется как положительный, если величина оптической плотности выше пороговой или равна ей.

### *6.9. Учет результатов анализа*

В протоколах анализа по совместному определению СЭТ результаты представляют в виде:

• СЭТ типов A, B, C, D и E обнаружены в образце массой 125 г (в 5 образцах по 25 г);

• СЭТ типов A, B, C, D и E не обнаружены в образце массой 125 г (в 5 образцах по 25 г).

Приложение
(рекомендуемое)

## Форма таблицы для записи результатов анализа

| Маркировка варианта | Значения ОП | | ОП исследуемого образца / ОП контроля | СЭА | СЭВ |
|---|---|---|---|---|---|
| | показания по ячейкам | среднее | | | |
| | | | | | |

**Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах**

**Методические указания**
**МУК 4.2.2429—08**

Редакторы Н. Е. Аколова, Н. В. Кожока
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 02.04.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25
Тираж 500 экз. Заказ 24

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

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

gost.e-ecolog.ru