

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Председателя  
Государственного комитета  
по стандартизации  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ С.А. Ивлев

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ В.И. Качан

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009 г.

ВРЕМЕННАЯ МЕТОДИКА  
КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВЫХ  
ЭНТЕРОТОКСИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ  
«РИДАСКРИН® SET A,B,C,D,E» ПРОИЗВОДСТВА R-BIOPHARM  
(ГЕРМАНИЯ)

Срок действия методики с 01.06.2009г по 01.06.2011г

Минск 2009

## СОДЕРЖАНИЕ

1	Область применения	3
2	Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы	3
3	Метод измерения	5
4	Требования безопасности	5
5	Требования к квалификации операторов	5
6	Условия выполнения измерений	5
7	Подготовка к проведению измерений	6
8	Выполнение измерений	9
9	Обработка результатов измерения	10
10	Оформление результатов испытаний	11
	Приложение А Нормативные ссылки	13

## **1 Область определения**

Настоящая методика предназначена для качественного определения стафилококковых энтеротоксинов в продовольственном сырье, пищевых продуктах животного происхождения (молоко, молочные продукты и сыры, мясо и мясопродукты, птица и птицепродукты) методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы «Ридаскрин<sup>®</sup> А,В,С,Д,Е» (Ridascreen<sup>®</sup> А,В,С,Д,Е) производства фирмы R-Biopharm (Германия).

Метод основан на детекции стафилококковых энтеротоксинов (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 энтеротоксины типов А, В, С, D и Е.

Согласно настоящей методике предел обнаружения стафилококковых энтеротоксинов соответствует диапазону массовых концентраций от 0,2 до 0,7 мкг/кг (в зависимости от типа токсина и вида продукта).

## **2 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы**

### **2.1 Средства измерений**

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более  $\pm 5\%$ );

Весы лабораторные общего назначения по не ниже ГОСТ 24104– 88Е  
3-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и ценой деления 0,001 г;

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая центробежное ускорение 29400 м/с<sup>2</sup> (относительное центробежное ускорение до 3000 g) и по возможности охлаждение до 10 °С

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 до плюс 25 °С ТУ 64-1-1382-72

Автоматический пипет-дозатор с переменным объемом 20-200 мм<sup>3</sup> с шагом 1,0 мм<sup>3</sup> и точностью дозирования не более  $\pm 2\%$ ; ТУ 64-16-55-90

Автоматический пипет-дозатор с переменным объемом 100-1000 мм<sup>3</sup> с шагом 5,0 мм<sup>3</sup> и точностью ТУ 64-16-55-90

дозирования не более  $\pm 1,5\%$ ;

Многоканальный пипет-дозатор с переменным  
объемом 50-250 мм<sup>3</sup> с шагом

ТУ 64-16-55-90

1,0 мм<sup>3</sup> и точностью дозирования не более  $\pm 2\%$ ;

Термометр (0 – 100) °С, цена деления 1 °С

ГОСТ 24498– 90

Колбы плоскодонные конические или круглые разной  
емкости

ГОСТ 25336-82

Пипетки: 2-1-50, 2-2-50

ГОСТ 20292-74

Пробирки стеклянные емкостью: 20 см<sup>3</sup>, П-2-20-  
14/23 ХС

ГОСТ 1770-74

Пробирки пластиковые для центрифугирования  
емкостью 10, 20, 50, 100 см<sup>3</sup>

Цилиндры на 100 – 250 см<sup>3</sup>

ГОСТ 1770-74

Флаконы стеклянные градуированные емкостью  
100, 200, 500 см<sup>3</sup>

ГОСТ 10782-85

## **2.2 Вспомогательные устройства и оборудование**

Гомогенизатор тканей (по ГОСТ 15906) или блендер

ГОСТ 15906

Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или  
пробирках или шуттель-аппарат (шейкер),  
обеспечивающий скорость вращения 2000 об/мин;

ТУ 64-1-2451-78

## **2.3 Реактивы и материалы**

Вода дистиллированная

ГОСТ 6709-72

n-гептан ч.д.а.

Натрий хлористый

ГОСТ 4233-77

Натрий фосфорнокислый однозамещенный

ГОСТ 245-76

Натрий фосфорнокислый двузамещенный

ГОСТ 4172-76

Тест-система «Ридаскрин<sup>®</sup> SET A,B,C,D,E»  
(Ridascreen<sup>®</sup> SET A,B,C,D,E)

R-Biopharm (Германия)

Стерильные фильтры, размер пор 0,2 мкм

ТУ 6-091181-76

Пленка «парафильм» или скотч

Бумага фильтровальная лабораторная

ГОСТ 12026-76

Допускается использование других средств измерения и вспомогательных устройств по метрологическим и техническим характеристикам не уступающих рекомендуемым, а также реактивов не ниже указанной чистоты.

### **3 Метод измерения**

Метод основан на специфическом взаимодействии антигена (стафилококковых энтеротоксинов) с антителами, адсорбированными на лунках планшета, приводящем к образованию комплекса антиген-антитело, последующей окраске комплекса с помощью субстрата и хромогена и измерении оптической плотности полученного раствора, которая зависит от наличия стафилококковых энтеротоксинов А,В,С,Д,Е в исследуемом образце.

Лунки А сенсibilизированы антителами к стафилококковому энтеротоксину типа А, лунки В сенсibilизированы антителами к стафилококковому энтеротоксину типа В, лунки С сенсibilизированы антителами к стафилококковому энтеротоксину типа С, лунки Д сенсibilизированы антителами к стафилококковому энтеротоксину типа Д, лунки Е сенсibilизированы антителами к стафилококковому энтеротоксину типа Е, лунки F, G сенсibilизированы антителами непривитых животных и служат отрицательными контролями, лунки Н сенсibilизированы антителами к стафилококковым энтеротоксинам и используются для положительного контроля.

### **4 Требования безопасности**

При выполнении работ персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности (ГОСТ 12.2.003);
- пожарной безопасности (ГОСТ 12.1.004);
- техники безопасности при работе в химической лаборатории (ППБ 1.04);
- санитарно-противоэпидемического режима и личной гигиены персонала микробиологических лабораторий (СП 17-129 РБ 2000);
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении исследований.

### **5 Требования к квалификации операторов**

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалистов, имеющих высшее или среднее специальное образование, владеющих техникой постановки иммуноферментного анализа и освоивших метод в процессе стажировки.

### **6 Условия выполнения измерений**

6.1 При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150 должны быть соблюдены следующие условия:

Температура воздуха при приготовлении растворов (20±2) °С;

Температура воздуха при выполнении измерений (20±5) °С;

Атмосферное давление 84,0 – 106,7 кПа (630 – 800 мм. рт. ст.);

Влажность воздуха (65±15) % при температуре 25 °С;

Напряжение в сети (220 ± 10) В;

Частота переменного тока (50 ± 0,5) Гц

Помещения для проведения измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

6.2 Реагенты, входящие в состав тест-системы «Ридаскрин® SET A,B,C,D,E» следует хранить в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Не допускается замораживание реагентов.

6.3 Неиспользованные стрипы (лунки) следует хранить в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в плотно закрытом оригинальном фольгированном пакете вместе с имеющимся осушителем.

6.4 Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-наборов других партий не допускается.

6.5 Раствор субстрата/хромогена светочувствителен, поэтому следует избегать прямого попадания на него солнечных лучей.

6.6 Не следует использовать реагенты, если:

- имеется голубая окраска красновато окрашенного раствора субстрата/хромогена до внесения в лунки;

- оптическая плотность меньше 0,5 ( $E_{450\text{нм}} < 0,5$ ) для положительного контроля.

### ***7 Подготовка к проведению измерений***

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, отбор и подготовка проб к анализу.

#### ***7.1 Подготовка измерительной аппаратуры***

Включение фотометра проводят согласно инструкции по эксплуатации, устанавливают рабочий режим измерения длины волны 450 нм. Измерения проводят не раньше, чем через 30 минут после включения прибора.

#### ***7.2 Предварительная подготовка тест-системы***

Перед началом работы тест-систему извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С) в течение не менее 30 минут.

#### ***7.3 Приготовление растворов***

##### ***7.3.1 Приготовление фосфатного буфера***

Взвешивают 0,55 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  и помещают в мерную колбу на 1000 см<sup>3</sup>, куда прибавляют 2,85 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  и 9,0 г натрия хлористого. Добавляют небольшое количество дистиллированной воды до полного растворения осадка, затем доводят

дистиллированной водой до метки. Раствор хранят в бутылке из темного стекла не более 3 месяцев.

### ***7.3.2 Приготовление моющего буфера***

Содержимое пакета концентрата для приготовления моющего буфера переносят в мерную колбу на 1000 см<sup>3</sup>. Прибавляют небольшое количество дистиллированной воды до полного растворения осадка, после чего доводят водой до метки. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 4-х недель

### ***7.4 Отбор образцов***

Отбор проб для исследований проводят согласно ТНПА на продукцию. Отобранные образцы могут храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 3-5 дней.

### ***7.5 Подготовка анализируемых образцов***

#### ***7.5.1 Подготовка проб сырого и пастеризованного молока.***

25 см<sup>3</sup> молока помещают в пробирку и центрифугируют в следующем режиме: 10 °С, 3500 g, 10 минут. При отсутствии центрифуги с охлаждением, перед центрифугированием пробу молока выдерживают в морозильной камере бытового холодильника в течение 10-15 минут (температура молока перед центрифугированием должна быть не выше 10 °С).

Удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования.

Отбирают 1 см<sup>3</sup> молока и переносят в чистую пробирку (перед тем как вылить молоко в пробирку, кончик пипетки вытирают фильтровальной бумагой для удаления возможных следов жира) и разводят дистиллированной водой в соотношении 1:20, затем стерильно фильтруют.

Полученный фильтрат используют для выполнения ИФА.

#### ***7.5.2 Подготовка проб молочных продуктов, сыров, мяса и мясопродуктов, птицы и птицепродуктов, а также других продуктов с содержанием жира менее 40%***

От пробы продукта отбирают навеску массой 25 г. Гомогенизируют в блендере или гомогенизаторе в течение 5 минут. Прибавляют 37,5 мл фосфатного буфера и помещают в шейкер на 15 минут (200-400 об/мин).

Полученную смесь центрифугируют в следующем режиме: 10°С, 3500 g, 10 минут. При отсутствии центрифуги с охлаждением, перед центрифугированием пробу выдерживают в морозильной камере бытового холодильника в течение 10-15 минут (температура пробы перед центрифугированием должна быть не выше 10 °С).

При необходимости удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности после центрифугирования, экстракт стерильно фильтруют.

Полученный фильтрат используют для выполнения ИФА

### **7.5.3 Подготовка проб молочных продуктов, сыров, мяса и мясопродуктов, птицы и птицепродуктов, а также других продуктов с содержанием жира с содержанием жира более 40%**

От пробы продукта отбирают навеску массой 25 г. Гомогенизируют в блендере или гомогенизаторе в течение 5 минут. Прибавляют 37,5 мл фосфатного буфера и помещают в шейкер на 15 минут (200-400 об/мин).

Полученную смесь центрифугируют в следующем режиме: 15 °С, 3500 g, 10 минут. При отсутствии центрифуги с охлаждением, перед центрифугированием пробу выдерживают в морозильной камере бытового холодильника в течение 10-15 минут (температура пробы перед центрифугированием должна быть не выше 15 °С).

В новую центрифужную пробирку переносят 5 мл надосадочного слоя, добавляют 5 мл n-гептана, перемешивают в течение 5 мин на шейкере (200-400 об/мин) Полученную смесь центрифугируют в следующем режиме: 15 °С, 3500 g, 10 минут. При отсутствии центрифуги с охлаждением, перед центрифугированием пробу выдерживают в морозильной камере бытового холодильника в течение 10-15 минут (температура пробы перед центрифугированием должна быть не выше 15 °С).

Удаляют полностью верхнюю гептановую фазу, экстракт стерильно фильтруют.

Полученный фильтрат используют для выполнения ИФА

### **7.6 Подготовка микротитровального планшета**

7.6.1 Рассчитывают необходимое количество стрипов (N) по формуле:

$$N = П, \tag{1}$$

где П - количество исследуемых проб,

N – количество стрипов, необходимое для исследования.

7.6.2 Извлекают микротитровальный планшет из фольгированного пакета, отделяют необходимое количество стрипов и помещают их в рамку микротитровального планшета. Остальные лунки сразу помешают в фольгированный пакет с осушителем, закрывают и хранят в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

7.6.3 Размечают координаты рабочих градуировочных растворов и проб, используя приведенный ниже рисунок.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7	П-8	П-9	П-10	П-11	П-12
B	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7	П-8	П-9	П-10	П-11	П-12
C	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7	П-8	П-9	П-10	П-11	П-12
D	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7	П-8	П-9	П-10	П-11	П-12
E	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7	П-8	П-9	П-10	П-11	П-12
F	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7	П-8	П-9	П-10	П-11	П-12
G	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7	П-8	П-9	П-10	П-11	П-12
H	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5	П-6	П-7	П-8	П-9	П-10	П-11	П-12

Рисунок 1 - Схема расположения лунок для рабочих градуировочных растворов и проб

где П-1, П-2, ...П-12 - исследуемые пробы,

1,2,3....12 - номера стрипов в планшете,

A, B, ...H - обозначения лунок в стрипах.

### **8 Выполнение измерений**

8.1 Перед проведением иммуноферментного анализа необходимо встряхнуть все компоненты тест-системы (положительный контроль, конъюгат, субстрат, хромоген, стоп-реагент) в течение 10-15 сек.

8.2 В лунки A-G вносят по 100 мм<sup>3</sup> проб, в лунку H вносят 100 мм<sup>3</sup> положительного контроля в соответствии с обозначениями на рамке планшета.

8.3 Аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивают содержимое. Встряхивания, постукивания планшетом по столу не допустимы.

8.4 Закрывают планшет пленкой «парафильм» (или заклеивают скотчем) и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. При невозможности соблюдения указанного температурного режима в помещении, инкубацию проводят в термостате при температуре (24±1) °C.

8.5 По окончании инкубации жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета, капельки жидкости, оставшиеся в лунках, удаляют путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой.

8.6 В каждую лунку вносят по 250 мм<sup>3</sup> моющего буфера, приготовленного по п. 7.3.2, (для этого желательно использовать многоканальный пипет-дозатор) и повторяют процедуру, описанную в п.8.5.

8.7 Процедуру промывки лунок, описанную в пп. 8.5-8.6, повторяют три раза.

8.8 В каждую лунку вносят по 100 мм<sup>3</sup> конъюгата, предварительно нагретого до комнатной температуры.

8.9 Аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивают содержимое. Встряхивания, постукивания планшетом по столу не допустимы.

8.10 Закрывают планшет пленкой «парафильм» (или заклеивают скотчем) и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа в темноте. При невозможности соблюдения указанного температурного режима в помещении, инкубацию проводят в термостате при температуре (24±1) °С.

8.11 По окончании инкубации, жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета, капельки жидкости, оставшиеся в лунках удаляют путем энергичного трехкратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой.

8.12 В каждую лунку вносят по 250 мм<sup>3</sup> моющего буфера, приготовленного по п. 7.3.2, (для этого желательно использовать многоканальный пипет-дозатор) и повторяют процедуру, описанную в п. 8.5. Процедуру промывки лунок, описанную в пп. 8.11-8.12 повторяют три раза.

8.13 В каждую лунку вносят по 50 мм<sup>3</sup> субстрата и 50 мм<sup>3</sup> хромогена, предварительно нагретого до комнатной температуры.

8.14 Аккуратными круговыми движениями перемешивают содержимое планшета

8.15 Закрывают планшет пленкой «парафильм» и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте. При невозможности соблюдения указанного температурного режима в помещении, инкубацию проводят в термостате при температуре (24±1) °С.

8.16 После инкубации в каждую лунку вносят по 100 мм<sup>3</sup> стоп-реагента и аккуратно круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

8.17 После добавления стоп-реагента в течение 60 минут измеряют оптическую плотность в каждой лунке на автоматическом микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

## ***9 Обработка результатов измерения***

### ***9.1 Определение пороговой величины***

Для каждой пробы отдельно рассчитывается среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках F и G (отрицательный контроль). К полученному среднему значению добавляют 0,15 для получения порогового значения.

### ***9.2 Область достоверности (контроль качества анализа).***

Оптическая плотность, измеренная в лунках с положительным контролем, должна быть равна или больше 0,5.

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

Если указанные выше условия не соблюдаются, результаты не подлежат интерпретации.

### **9.3. Интерпретация результатов**

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

### **10 Оформление результатов испытаний**

Результаты измерений оформляют по форме, установленной в лаборатории системой регистрации данных.

Результаты должны включать следующую информацию:

- Наименование (шифр) пробы;
- Дату проведения измерений;
- Результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;
- Окончательный результат измерений;
- Фамилию оператора.

В протоколах анализа по определению стафилококковых энтеротоксинов, результаты представляют в виде:

Стафилококковые энтеротоксины (например, типов А, С) обнаружены в образце массой 25 г.

Стафилококковые энтеротоксины (типов А, В, С, D, E) не обнаружены в образце массой 25 г.

Форма таблицы для записи результатов анализа.

Наименование пробы	Значения оптической плотности в лунках, (OD)			Оптическая плотность положительного контроля, (OD)	Оптическая плотность исследуемой пробы в лунке, (OD)					Пороговая величина	Результат анализа
	F	G	Среднее		A	B	C	D	E		

Все представленные расчеты следует проводить с помощью программного обеспечения RIDA® Soft, разработанного фирмой R-Biopharm (Германия) специально для

обработки результатов измерений, полученных с помощью тест-систем Ридаскрин<sup>®</sup> (Ridascreen<sup>®</sup>).

Методика разработана специалистами лаборатории микробиологии Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Зав. лабораторией микробиологии, к.б.н

Вед. науч.сотрудник, к.б.н.

Млад. науч. сотрудник

Л.А.Мельникова

Н.В.Дудчик

Т.С.Трешкова

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

### Нормативные ссылки

1. ГОСТ 12.2.003-91 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.
2. ГОСТ 21.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.
3. ППБ 1.04-2002 Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды.
4. СП 17-129 РБ 2000 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности.