

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Методы определения бактерий рода
Campylobacter в пищевых продуктах**

Дополнения и изменения 1 к МУК 4.2.2321—08

**Методические указания
МУК 4.2.2878—11**

Издание официальное

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

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

**Методы определения бактерий рода
Campylobacter в пищевых продуктах**

Дополнения и изменения 1 к МУК 4.2.2321—08

**Методические указания
МУК 4.2.2878—11**

ББК 51.23

М54

М54 Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах. Доп. и изм. 1 к МУК 4.2.2321—08: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—8 с.

ISBN 978—5—7508—1021—5

1. Разработаны Учреждением Российской академии медицинских наук Научно-исследовательским институтом питания (В. А. Тутельян, С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, И. Б. Быкова, А. В. Булахов, А. В. Ананьева), ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» (О. В. Захарова, Н. Я. Салова) при участии фирмы «BioMerieux» (Т. Н. Душкина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 02.06.2011 № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 24.06.2011.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.23

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

Подписано в печать 12.10.11

Формат 60x88/16

Тираж 200 экз.

Печ. л. 0,5

Заказ 131

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

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

© Роспотребнадзор, 2011

© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

УТВЕРЖДАЮ

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

Г. Г. Онищенко

24 июня 2011 г.

Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Методы определения бактерий рода
Campylobacter в пищевых продуктах**

Дополнения и изменения 1 к МУК 4.2.2321—08

**Методические указания
МУК 4.2.2878—11**

Внести дополнения и изменения в МУК 4.2.2321—08:

1. Раздел 1. «Общие положения и область применения» дополнить абзацем 1.3 следующего содержания:

«1.3. Настоящие методические указания устанавливают методы определения бактерий рода *Campylobacter* в продовольственном сырье и пищевых продуктах животного происхождения на основе бактериологического анализа (качественного и количественного с идентификацией до вида), а также фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа (качественного недифференцированного суммарного определения бактерий видов *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, обуславливающих основную часть ОКИ кампилобактериозной природы у человека)».

2. Раздел 2. «Сущность метода» изложить в новой редакции:

«2. Сущность методов

2.1. Бактериологический метод определения бактерий рода *Campylobacter* основан на высеве определенных количеств продукта в жидкие селективные среды, содержащие антибиотики и азротолрантные добавки с последующим пересевом на поверхность твердых селективных сред, инкубировании посевов, выявлении в этих посевах бактерий, способных расти и образовывать типичные колонии на поверхности селективного агара, с последующим выделением чистой культуры. Все этапы инкубации посевов осуществляются в микроаэрофильных условиях. Идентификация чистых культур проводится по совокупности морфоло-

гических, биохимических и других признаков, определяющих принадлежность к видам бактерий рода *Campylobacter*.

2.2. Метод фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа бактерий рода *Campylobacter* основан на связывании бактериальных антигенов, находящихся в бульоне обогащения, с антителами, адсорбированными на внутренней поверхности пипетирующего устройства (твердая фаза), последующем удалении (отмывке) несвязанных компонентов, добавлении антител, меченых щелочной фосфатазой, и флюоресцентно-меченого субстрата, и измерении флюоресценции продукта гидролиза флюоресцентно-меченого субстрата (4-метил-умбелиферилфосфата), который катализируется щелочной фосфатазой. Интенсивность флюоресценции измеряется при длине волны 450 нм.

2.2.1. Для фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа используют автоматические анализаторы, позволяющие проводить измерение флюоресценции 4-метил-умбелиферона при 450 нм, и тест-наборы, в состав которых входят сенсibiliзирoванные антителами наконечники, используемые в качестве пипетирующего устройства; и стрипы из 10 лунок, содержащие реагенты для проведения иммунофлюоресцентного анализа, зарегистрированные в РФ в установленном порядке. Предел обнаружения бактерий рода *Campylobacter* при использовании данного метода соответствует 1 клетке на 25 г (при наличии предобогащения).

2.2.2. Для определения бактерий рода *Campylobacter* методом фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа используют анализаторы иммуноферментные и тест-наборы, зарегистрированные в РФ в установленном порядке и обеспечивающие проведение измерений с характеристиками специфичности и чувствительности, указанными в п.п. 1.3 и 2.2.1).

3. В разделе 3 «Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды» пункт 3.1 «Аппаратура и инструментарий» дополнить строкой:

Автоматический ИФА анализатор для фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа типа VIDAS® или miniVIDAS®, или с аналогичными характеристиками, подобные BioMerieux, Франция или аналог

4. В разделе 3 пункт 3.2 «Лабораторная посуда и материалы» дополнить строками:

Пакет для гомогенизации с фильтром, подобные BioMerieux, Франция или аналог
Набор реагентов для определения бактерий рода *Campylobacter* типа VIDAS®Campylobacter (CAM) или с аналогичными характеристиками, подобные BioMerieux, Франция или аналог

5. Раздел 3 «Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды» дополнить пунктом 3.5 в следующей редакции:

«3.5. Состав тест-набора для фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа»

В состав тест-набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для исследования 26 проб и 4 контрольных образцов, состоящий из следующих компонентов:

30 стрипов для определения бактерий рода <i>Campylobacter</i>	STR	Готовы к использованию
30 наконечников	SPR	Готовы к использованию. На внутреннюю поверхность наконечников нанесены антитела к поверхностным антигенам <i>Campylobacter</i>
Стандарт (1 фл. по 6 мл)	S1	Готов к использованию. Очищенный и инактивированный антиген <i>Campylobacter</i> + консервант + белковые стабилизаторы. Доверительный интервал указан на калибровочной карте
Положительный контроль определения (1 фл. по 6 мл)	C1	Готов к использованию. Очищенный и инактивированный антиген <i>Campylobacter</i> + консервант + белковые стабилизаторы. Доверительный интервал указан на калибровочной карте
Отрицательный контроль определения (1 фл. по 6 мл)	C2	Готов к использованию. Забуференный физиологический раствор – твин + консервант. Максимальное приемлемое значение указано на калибровочной карте
1 калибровочная карта		Лист спецификаций с фабричными установками для калибровки тестов.
1 инструкция		

3.5.1. Состав стрипа для фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа. Каждый стрип в тест-наборе состоит из 10 лунок, запечатанных фольгой, на которую нанесен штрих-код, несущий информацию о типе анализа, номере партии и сроке годности. Фольга перфорирована над лункой для внесения образца. Последняя лунка представляет собой кювету, в которой происходит считывание результата. Прочие лунки содержат реактивы для анализа. Распределение лунок в стрипе:

Лунка	Реактивы
1	Лунка для внесения образца: внесите 0,5 см ³ бульона обогащения (обогащенной культуры), стандарта или контроля
2	Предпромывочный буфер (400 мм ³): забуференный физиологический раствор, содержащий твин (150 мМ/л) pH 7,6 + консервант
3-4-5-7-8-9	Промывочный буфер (600 мм ³): забуференный физиологический раствор, содержащий твин (150 мМ/л) pH 7,6 + консервант
6	Конъюгат (400 мм ³): антитела (IgG) к <i>Campylobacter</i> , меченные щелочной фосфатазой + консервант
10	Кювета, содержащая субстрат (300 мм ³): 4-метил-умбелиферил-фосфат (0,6 М/л) + диэтаноламин (0,62 М/л или 6,6 %, pH 9,2) + консервант

3.5.2. Для определения бактерий рода *Campylobacter* методом фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа допускается использование другого оборудования и тест-наборов аналогичного назначения, зарегистрированных в РФ в установленном порядке, с аналогичными характеристиками чувствительности и специфичности».

6. Раздел 4 «Подготовка к анализу» дополнить пунктом 4.3 в следующей редакции:

«4.3. Требования к выполнению фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа

4.3.1. 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 прибор.

Анализатор должен находиться в помещении, приспособленном для проведения микробиологических исследований. При работе с тест-наборами необходимо соблюдать следующие правила:

- не использовать наконечники с поврежденной упаковкой;
- не использовать поврежденные стрипы;
- не использовать набор по истечении срока годности;
- не смешивать реактивы из различных партий;
- пролитые жидкости необходимо тщательно вытирать после обработки детергентом и раствором бытового отбеливателя с содержанием натрия гипохлорита не менее 0,5 %. Не автоклавировать растворы, содержащие отбеливатель;
- анализаторы необходимо регулярно чистить и обеззараживать в соответствии с руководством по эксплуатации приборов.

Тест-набор содержит едкий реактив диэтаноламин, а также натрия азид, который со свинцом и медью образует взрывчатые азиды металлов. Если жидкости, содержащие азид натрия, сливаются в водопроводную систему, необходимо промывать водосток во избежание их накопления.

4.3.2. 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.

4.3.3. Условия выполнения измерений

Измерения проводятся в нормальных лабораторных условиях:

- температура окружающего воздуха (20 ± 5) °С;

- атмосферное давление (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность (65 ± 15) %».

7. Раздел 7 дополнить пунктом 7.3 в следующей редакции:

«7.3. Проведение фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа

7.3.1. Подготовка анализатора к работе:

- Перед использованием реактивов новой партии в анализатор вводят (автоматически или вручную) спецификации реактивов, используя калибровочную карту, входящую в каждый набор. Процедуру необходимо проводить только один раз для каждой партии реактивов.

- Для каждой новой партии реактивов проводят калибровку прибора, используя стандарт, входящий в состав набора. Калибровку проводят после ввода данных партии, но не реже одного раза в 14 дней. Для этого в отдельные стрипы вносят по $0,5 \text{ см}^3$ реактива С1, С2 и в два стрипа реактив S1 из тест-набора. Необходимо ввести информацию об образце и контролях в анализатор для создания рабочего листа. Установить стрипы и наконечники в анализатор и запустить программу.

Эта операция необходима для построения точной калибровочной кривой и компенсации вариаций, которые могут возникнуть при хранении набора. Стандарт S1 необходимо тестировать в двукратной повторности согласно руководству по эксплуатации прибора. Результаты должны находиться в пределах установленного диапазона, указанного на калибровочной карте. Если результат не соответствует диапазону, следует повторить калибровку.

7.3.2. Подготовка образцов к фермент-связанному флюоресцентному иммуноанализу.

Отобрать в пробирку $1\text{--}2 \text{ см}^3$ бульона обогащения, инкубированного по п. 7.1 МУК 4.2.2321—08, закрыть и нагревать на водяной бане (15 ± 1) мин при $95\text{--}100$ °С. Охладить 10 мин, перемешать и внести $0,5 \text{ см}^3$ в стрип из тест-набора.

Оставшуюся часть бульона хранят в холодильнике при $2\text{--}4$ °С для подтверждения положительных образцов.

7.3.3. Проведение фермент-связанного флюоресцентного иммуноанализа.

Перед проведением анализа необходимое количество компонентов тест-набора оставить при комнатной температуре на 30 мин.

Для каждого анализа используется 1 стрип и 1 наконечник из тест-набора. В открытую лунку стрипа вносят $0,5 \text{ см}^3$ термостатированного образца по п. 7.3.2. Далее стрипы и наконечники устанавливают в анализатор, вводят название соответствующих образцов и запускают анализ. Время анализа приблизительно 70 мин.

7.3.4. Интерпретация результатов.

Оптический сканер прибора измеряет флюоресценцию дважды в оптической кювете для каждого образца. Первый раз измеряется фон субстрата и кюветы перед внесением в нее субстрата. Второй раз флюоресценция измеряется после внесения субстрата в конус и образования флюоресцирующего продукта в результате ферментативной реакции на поверхности конуса. Вычитание фона кюветы из последнего измерения дает относительную величину флюоресценции – ОВФ (Relative Fluorescence Value) тестируемого образца. Интерпретация значений ОВФ проводится прибором автоматически согласно формуле:

$$[\text{Результат теста} = \text{ОВФ образца} / \text{ОВФ стандарта.}]$$

Результат теста	Интерпретация
< 0,1	Отрицательный
≥ 0,1	Положительный

Результат теста со значением меньше порогового указывает на то, что образец не содержит антигена *Campylobacter*, либо содержит его в концентрации ниже порога определения. Результат теста со значением равным или больше порогового свидетельствует о том, что образец загрязнен бактериями рода *Campylobacter*. В этом случае следует провести подтверждение положительного результата по п. 7.3.5.

Результаты также считаются недействительными, если (1) значение ОВФ фона выше ожидаемого значения или (2) нет информации о значениях ОВФ стандарта. В первом случае возможно загрязнение субстрата, в связи с чем необходимо провести повторное тестирование образца с новым стрипом. Во втором случае должен быть протестирован новый стандарт из той же партии и результаты теста должны быть пересчитаны по этому стандарту.

На принтер выводится информация – тип теста, номер образца, дата и время анализа, номер партии и дата окончания срока годности набора, значения ОВФ, результат и его интерпретация.

7.3.5. Подтверждение положительного результата.

Подтверждение положительного результата проводят путём высева 0,1 мл хранившегося в холодильнике бульона обогащения, полученного по п. 7.3.2, на поверхность одной из селективных сред (по п. 4.2.2). Инкубацию образцов проводят при температуре $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20—24 ч, при отсутствии роста инкубировать ещё 24 ч.

При наличии характерных колоний необходимо провести идентификацию до 5 подозрительных колоний на принадлежность к бактериям рода *Campylobacter* по п. 8.1.

При получении противоречивых результатов (положительных альтернативным методом, не подтвержденных стандартным методом), для проверки следует использовать дополнительные методы».