

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Обнаружение патогенных
микроорганизмов в пищевых продуктах
и объектах окружающей среды
методом фермент-связанного
флуоресцентного анализа с применением
автоматического анализатора**

**Методические указания
МУК 4.2.3262—15**

Издание официальное

Москва • 2015

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

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

**Обнаружение патогенных микроорганизмов
в пищевых продуктах и объектах
окружающей среды методом
фермент-связанного флуоресцентного анализа
с применением автоматического анализатора**

**Методические указания
МУК 4.2.3262—15**

ББК 51.23
О20

О20 Обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом фермент-связанного флуоресцентного анализа с применением автоматического анализатора: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—18 с.

ISBN 978—5—7508—1404—6

1. Разработаны: ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (А. И. Верещагин, М. В. Зароченцев, М. А. Ярославцева), ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербурге» (Т. А. Гречанинова, Н. С. Григорьева), ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» (Н. Я. Салова, Л. А. Лунина) при участии ООО «биоМерье Рус» (Т. Н. Душкина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 30 мая 2013 г. № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 21 мая 2015 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

© Роспотребнадзор, 2015
© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

Содержание

1. Назначение и область применения	4
2. Метод измерений	5
3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и питательные среды	5
3.1. Средства измерений.....	5
3.2. Вспомогательные устройства	5
3.3. Реактивы и питательные среды	6
4. Требования безопасности и квалификации операторов	6
5. Отбор и подготовка проб.....	6
6. Проведение исследований	7
6.1. Выявление бактерий рода <i>Salmonella</i>	7
6.1.1. Выявление бактерий рода <i>Salmonella</i> за 24 часа	7
6.1.2. Выявление бактерий рода <i>Salmonella</i> за 48 часов	9
6.2. Выявление <i>Listeria monocytogenes</i>	10
6.2.1. Выявление бактерий вида <i>Listeria monocytogenes</i> за 24 часа	11
6.2.2. Выявление бактерий вида <i>Listeria monocytogenes</i> за 48 часов	12
6.2.3. Выявление и дифференциация бактерий вида <i>Listeria monocytogenes</i> и <i>Listeria spp.</i>	13
6.3. Выявление антигенов <i>Escherichia coli</i> O157:H7	15
6.3.1. Выявление антигенов штаммов <i>Escherichia coli</i> O157:H7 в пищевых продуктах	15
6.3.2. Выявление антигенов штаммов <i>Escherichia coli</i> O157:H7 в пищевых продуктах и объектах внешней среды	17

УТВЕРЖДАЮ

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

А. Ю. Попова

21 мая 2015 г.

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

**Обнаружение патогенных микроорганизмов
в пищевых продуктах и объектах окружающей среды
методом фермент-связанного флуоресцентного анализа
с применением автоматического анализатора**

**Методические указания
МУК 4.2.3262—15**

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом фермент-связанного флуоресцентного анализа с применением автоматического анализатора.

1.2. Методические указания предназначены для специалистов лабораторий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также иных организаций и учреждений, занимающихся вопросами оценки качества и безопасности пищевых продуктов, объектов окружающей среды, аккредитованных (лицензированных) на проведение соответствующих исследований в установленном порядке.

1.3. Методические указания носят рекомендательный характер.

2. Метод измерений

Качественное автоматизированное определение микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах внешней среды основано на технологии фермент-связанного флуоресцентного анализа.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и питательные среды

3.1. Средства измерений

Автоматический иммуноферментный анализатор

Автоматический пипеточный дозатор с одно-
разовыми наконечниками объемом от 100 до
1 000 мкл

Весы лабораторные общего назначения 2-го и
4-го класса точности с наибольшим пределом
взвешивания 200 г

Примечание. Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Вспомогательные устройства

Аппарат универсальный для встряхивания
жидкости в колбах и пробирках (или другая
аппаратура для встряхивания)

Водяная баня с терморегулятором, позволяющая
поддерживать температуру от 0 до 100 °С

Система для нагрева образцов в стрипах

Термостат электрический, позволяющий
поддерживать температуру 15—65 °С с

отклонением от заданной температуры ± 1 °С

Стерилизатор паровой медицинский или
аналогичный

Гомогенизатор бактериологический
перистальтического типа со стерильными
пластиковыми (или другими выдерживающими
условия стерилизации) пакетами

Холодильник бытовой электрический
Ламинарный бокс
Облучатель бактерицидный настенный (или
других видов)

Примечание. Допускается использование вспомогательных устройств с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Реактивы и питательные среды

Наборы для определения:

- *Salmonella*,
 - *Listeria monocytogenes Xpress*,
 - *Listeria monocytogenes II*,
 - *Listeria Duo*,
 - *Escherichia coli* O157,
- основанные на технологии ИФА.

Примечание. Допускается использование реактивов и питательных сред с аналогичными или лучшими характеристиками.

4. Требования безопасности и квалификации операторов

Исследования пищевых продуктов и объектов окружающей среды методом наиболее вероятного числа с применением автоматического экспресс-анализатора проводят в соответствии с СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц с высшим или средним специальным образованием, прошедших соответствующую подготовку и имеющих навыки работы в области микробиологических исследований.

5. Отбор и подготовка проб

Отбор проб проводят с учетом требований нормативно-технической документации на конкретный вид продукта (образца из внешней среды) в асептических условиях с использованием стерильного оборудования. Подготовку проб осуществляют с применением аппаратуры и

материалов, указанных в международных, межгосударственных и национальных стандартах.

6. Проведение исследований

6.1. Выявление бактерий рода *Salmonella*

Тесты *Salmonella* предназначены для качественного определения бактерий рода *Salmonella* в продуктах питания и образцах внешней среды путем автоматической иммуноконцентрации сальмонелл после предварительного неселективного обогащения с последующим автоматизированным определением сальмонелл.

Реактивы, необходимые для анализа, находятся в лунках стрипа. Все этапы анализа выполняются прибором автоматически. Реакционная смесь циркулирует в наконечнике и переносится из лунки в лунку. Часть бульона обогащения (инкубированного в бульоне обогащения образца) вносится в стрип. Антигены *Salmonella* связываются с антителами, нанесенными на внутреннюю поверхность наконечника. Несвязанные компоненты удаляются на этапе отмывки. Далее к реакционной смеси добавляются антитела, связанные со щелочной фосфатазой, и антигены *Salmonella*, связанные с антителами на внутренней поверхности наконечника, связываются с ними. Несвязанные компоненты удаляются на этапе отмывки.

На этапе определения осуществляется циркуляция реакционной смеси в лунке, содержащей субстрат (4-метил-умбелиферилфосфат). Фермент в реакционной смеси катализирует гидролиз субстрата до флуоресцирующего продукта (4-метил-умбелиферона), флуоресценция которого измеряется при 450 нм. На конечном этапе прибор автоматически анализирует полученные значения, сравнивает их с внутренними контрольными значениями (порогами) и выдает результат (положительный/отрицательный).

6.1.1. Выявление бактерий рода *Salmonella* за 24 часа

Метод качественного определения бактерий рода *Salmonella* в продуктах питания и образцах внешней среды с использованием анализатора за 24 ч.

6.1.1.1. Алгоритм проведения исследования

Навеску продукта (образца из внешней среды), в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие бактерий рода *Salmonella* в соответствии с нормативно-технической документацией на анализируемый продукт (образец из внешней среды), стерильно вносят в забуференную пептонную воду.

Соотношение массы (объема) продукта (образца из внешней среды) и забуференной пептонной воды – 1 : 9 по объему.

Стерильно и без промедления вносят добавку в соотношении 1 мл на 255 мл забуференной пептонной воды.

Посевы термостатируют при температуре $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18—24 ч.

По окончании инкубации переносят 2—3 мл в пробирку. Нагревают (5 ± 1) мин при $95\text{—}100^\circ\text{C}$, охлаждают, перемешивают и вносят 0,5 мл в лунку для образца на стрипе.

Начинают анализ, как это описано в руководстве пользователя. Полностью автоматизированный анализ завершают приблизительно через 45 мин. После окончания анализа результаты распечатываются автоматически.

6.1.1.2. Интерпретация результатов

Прибор автоматически анализирует полученные значения, сравнивает их с внутренними контрольными значениями (порогами). При пределах значения теста меньше 0,25 результат интерпретируется как отрицательный (Negative); при значении больше или равном 0,25 – как положительный (Positive). Результат теста со значением меньше порогового свидетельствует о том, что образец не содержит антигенов *Salmonella* либо их титр ниже порога определения. Результат со значением больше порогового или равным пороговому свидетельствует о том, что в образце содержатся антигены *Salmonella*.

Все положительные результаты теста требуют подтверждения.

Для подтверждения положительного результата возможно:

- использование селективного/хромогенного агара для получения типичных колоний;
- использование идентификации на стрипе API типичной колонии, выделенной на агаризованной среде.

6.1.2. Выявление бактерий рода *Salmonella* за 48 часов

Метод качественного определения бактерий рода *Salmonella* в продуктах питания и образцах внешней среды с использованием анализатора за 48 ч.

6.1.2.1. Алгоритм проведения исследования

Предварительное обогащение.

Навеску продукта (образца из внешней среды), в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие бактерий рода *Salmonella* в соответствии с нормативно-технической документацией на анализируемый продукт (образец из внешней среды), стерильно вносят в забуференную пептонную воду.

Соотношение массы (объема) продукта (образца из внешней среды) и забуференной пептонной воды – 1 : 9 по объему.

Посевы термостатируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 16—20 ч.

Обогащение.

После инкубации переносят 0,1 мл предварительно обогащенной суспензии в 10 мл бульона RVS. Инкубируют 6—8 ч при $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Вторичное обогащение.

По окончании инкубации переносят 1 мл бульона RVS в 10 мл бульона М. Инкубируют повторно бульон RVS при $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 16—20 ч. Бульон М инкубируют при $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 16—20 ч. По окончании инкубации гомогенизируют бульон М. Нагревают (15 ± 1) мин при $(95—100)^\circ\text{C}$, охлаждают, перемешивают и вносят 0,5 мл в лунку для образца на стрипе. Бульоны М и RVS хранят при 2—8 °С до окончания анализа (для подтверждающего теста).

Начинают анализ, как это описано в руководстве пользователя. Полностью автоматизированный анализ завершается приблизительно через 45 мин. После окончания анализа результаты распечатываются автоматически.

6.1.2.2. Интерпретация результатов

Прибор автоматически анализирует полученные значения, сравнивает их с внутренними контрольными значениями (порогами). При пределах значения теста меньше 0,23 результат интерпретируется как отрицательный (Negative); при значении больше или равном 0,23 – как положительный (Positive). Результат теста со значением меньше порогово-

го свидетельствует о том, что образец не содержит антигенов *Salmonella* либо их титр ниже порога определения. Результат со значением больше порогового или равным пороговому свидетельствует о том, что в образце содержатся антигены *Salmonella*.

Все положительные результаты теста требуют подтверждения. Варианты подтверждения положительного результата по п. 6.1.1.2.

6.2. Выявление *Listeria monocytogenes*

Тест *L. monocytogenes Xpress* предназначен для иммуноферментного определения антигенов листерий в продуктах питания и образцах внешней среды. На внутреннюю поверхность наконечника, используемого как пипетирующее устройство и носитель твердой фазы, нанесены антитела к *L. monocytogenes*. Реактивы, необходимые для анализа, находятся в лунках стрипа. Все этапы анализа выполняются автоматически. Реакционная смесь переносится из лунки в лунку и перемешивается наконечником. Некоторую часть бульона обогащения вносят в стрип. Присутствующие в бульоне обогащения антигены *Listeria monocytogenes* связываются с антителами к ним, нанесенным на внутреннюю стенку наконечника. Несвязанные компоненты удаляются отмывкой. Наконечник переносит реакционную смесь в лунку с антителами к антигенам *L. monocytogenes*, мечеными биотином (конъюгатом). Эти антитела связываются с антигенами *L. monocytogenes*, которые связаны с антителами на стенке наконечника. Наличие биотина определяется после инкубации со стрептавидином, меченым щелочной фосфатазой. Несвязанные компоненты удаляются на дальнейших этапах отмывки. На конечном этапе определения реакционная смесь циркулирует в лунке с субстратом (4-метил-умбелиферилфосфат). Фермент конъюгата катализирует гидролиз субстрата до флуоресцирующего продукта (4-метил-умбелиферона), флуоресценция которого измеряется при 450 нм. В конце анализа прибор автоматически анализирует результат и рассчитывает тестовое значение. Оно интерпретируется до окончательного результата (положительный или отрицательный) при сравнении с набором стандартных значений, хранящихся в памяти прибора (пороговых значений).

6.2.1. Выявление бактерий вида *Listeria monocytogenes* за 24 часа

Метод качественного определения бактерий вида *L. monocytogenes* в продуктах питания и образцах окружающей среды с использованием анализатора за 24 ч.

6.2.1.1. Алгоритм проведения исследования

Навеску продукта (образца из внешней среды), в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие бактерий вида *L. monocytogenes* в соответствии с нормативно-технической документацией на анализируемый продукт (образец из внешней среды), стерильно вносят в бульон LMX.

Соотношение массы (объема) продукта (образца из внешней среды) и бульона LMX – 25 : 225 по объему.

Стерильно и без промедления вносят добавку в соотношении 0,5 мл на 25 г образца.

Посевы термостатируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 26—30 ч.

По окончании инкубации гомогенизируют бульон LMX. Нагревают (5 ± 1) мин при 95—100 °С, охлаждают, перемешивают и вносят 0,25 мл в лунку для образца на стрипе.

Начинают анализ, как это описано в руководстве пользователя. Полностью автоматизированный анализ завершается приблизительно через 80 мин. После окончания анализа результаты распечатываются автоматически.

6.2.1.2. Интерпретация результатов

Прибор автоматически анализирует полученные значения, сравнивает их с внутренними контрольными значениями (порогами). При пределах значения теста меньше 0,05 результат интерпретируется как отрицательный (Negative); при значении больше или равном 0,05 – как положительный (Positive). Результат теста со значением меньше порогового свидетельствует о том, что образец не содержит антигенов *L. monocytogenes* либо их титр ниже порога определения. Результат со значением больше порогового или равным пороговому свидетельствует о том, что в образце содержатся антигены *L. monocytogenes*.

Все положительные результаты теста требуют подтверждения.

Для подтверждения положительного результата возможно:

- использование хромогенного агара без идентификации типичных колоний. Наличие типичных колоний *Listeria monocytogenes* при высеве из бульона LMX достаточно для подтверждения положительного результата;
- использование идентификации на стрипе API типичной колонии, выделенной на агаре типа Отгавиани-Агости. При этом предварительного выделения чистой культуры не требуется, если используемая колония полностью изолирована.

6.2.2. Выявление бактерий вида *Listeria monocytogenes* за 48 часов

Метод качественного определения бактерий вида *L. monocytogenes* в продуктах питания и образцах внешней среды с использованием анализатора за 48 ч.

6.2.2.1. Алгоритм проведения исследования

Навеску продукта (образца из внешней среды), в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие бактерий вида *L. monocytogenes* в соответствии с нормативно-технической документацией на анализируемый продукт (образец из внешней среды), стерильно вносят в бульон Фразера в половинной концентрации.

Соотношение массы (объема) продукта (образца из внешней среды) и бульона Фразера в половинной концентрации – 25 : 225 по объему.

Посевы термостатируют при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (25 ± 1) ч.

По окончании инкубации перемешивают и переносят 0,1 мл в 10 мл бульона Фразера. Инкубируют (25 ± 1) ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Вносят 0,5 мл в лунку для образца на стрипе.

Начинают анализ, как это описано в руководстве пользователя. Полностью автоматизированный анализ завершается приблизительно через 70 мин. После окончания анализа результаты распечатываются автоматически.

6.2.2.2. Интерпретация результатов

Прибор автоматически анализирует полученные значения, сравнивает их с внутренними контрольными значениями (порогами). При пределах значения теста меньше 0,05 результат интерпретируется как отрицательный (Negative); при значении больше или равном 0,05 – как положительный (Positive). Результат теста со значением меньше порогово-

го свидетельствует о том, что образец не содержит антигенов *L. monocytogenes* либо их титр ниже порога определения. Результат со значением больше порогового или равным пороговому свидетельствует о том, что в образце содержатся антигены *L. monocytogenes*.

Все положительные результаты теста требуют подтверждения. Варианты подтверждения положительного результата по п. 6.2.1.2.

6.2.3. Выявление и дифференциация бактерий вида *Listeria monocytogenes* и *Listeria spp.*

Метод одновременного качественного определения и дифференциации бактерий вида *L. monocytogenes* и *Listeria spp.* в пищевых продуктах и образцах внешней среды с использованием анализатора за 48 ч.

Тест *Listeria Duo* предназначен для одновременного качественного определения и дифференциации *Listeria monocytogenes* и *Listeria spp.* в пищевых продуктах и образцах внешней среды. На внутреннюю поверхность наконечника, используемого как пипетирующее устройство и носитель твердой фазы, нанесены антитела к *L. monocytogenes* и *Listeria*. Реактивы, необходимые для анализа, находятся в лунках стрипа. Все этапы анализа выполняются автоматически. Реакционная смесь последовательно переносится из лунки в лунку наконечником. Определенный объем бульона обогащения вносится в стрип. Присутствующие в нем антигены связываются с антителами на внутренней поверхности наконечника. Несвязанные компоненты удаляются при отмывке.

Определение *Listeria monocytogenes*. После этапа отмывки происходит образование комплекса связанных со щелочной фосфатазой антител к *Listeria monocytogenes* и антигена *Listeria monocytogenes*, связанного с антителами на стенке наконечника. Несвязанные компоненты удаляются на этапе отмывки. На этапе определения осуществляется циркуляция реакционной смеси в лунке, содержащей субстрат (4-метилумбелиферилфосфат). При этом фермент, содержащийся в реакционной смеси, катализирует гидролиз субстрата до флуоресцирующего продукта (4-метил-умбелиферона), флуоресценция которого измеряется при 450 нм.

Определение *Listeria*. После первого считывания осуществляется циркуляция реакционной смеси в лунке, содержащей меченые щелочной фосфатазой антитела к *Listeria*, и происходит их связывание с антигенами *Listeria*, связанными с антителами на стенке наконечника. На этапе

определения осуществляется циркуляция реакционной смеси в лунке, содержащей субстрат (4-метил-умбелиферилфосфат). При этом фермент, содержащийся в реакционной смеси, катализирует гидролиз субстрата до флуоресцирующего продукта (4-метил-умбелиферона), флуоресценция которого измеряется при 450 нм.

После окончания анализа прибор автоматически рассчитывает результат, сравнивает полученные значения с контрольными (пороговыми) значениями и интерпретирует результат как отрицательный или положительный.

6.2.3.1. Алгоритм проведения исследования

Навеску продукта (образца из внешней среды), в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие бактерий вида *L. monocytogenes* и *Listeria spp.* в соответствии с нормативно-технической документацией на анализируемый продукт (образец из внешней среды), стерильно вносят в бульон LX.

Соотношение массы (объема) продукта (образца из внешней среды) и бульона LX – 25 : 225 по объему.

Посевы термостатируют при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 22—26 ч.

По окончании инкубации перемешивают и переносят 1 мл в 10 мл бульона LX. Инкубируют (25 ± 1) ч при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$. Нагревают (5 ± 1) мин при 95—100 °С, охлаждают, перемешивают и вносят 0,5 мл в лунку для образца на стрипе.

Начинают анализ, как это описано в руководстве пользователя. Полностью автоматизированный анализ завершается приблизительно через 2 ч. После окончания анализа результаты распечатываются автоматически.

6.2.3.2. Интерпретация результатов

Прибор автоматически анализирует полученные значения для каждого теста (*Listeria monocytogenes* и *Listeria spp.* в наборе, сравнивая их с внутренними контрольными значениями (порогами). При пределах значения теста *Listeria monocytogenes* меньше 0,05 результат интерпретируется как отрицательный (Negative), больше или равно 0,05 – как положительный (Positive). При пределах значения теста *Listeria spp.* меньше 0,10 результат интерпретируется как отрицательный (Negative), больше или равно 0,10 – как положительный (Positive). Значения,

меньшие, чем пороговые, свидетельствуют о том, что образец не содержит антигенов *Listeria monocytogenes* или *Listeria spp.* либо их титры ниже порога определения. Значения, большие, чем пороговые или равные пороговым, свидетельствуют о том, что образец загрязнен *Listeria monocytogenes* или *Listeria spp.*

Все положительные результаты теста требуют подтверждения.

Варианты подтверждения положительного результата по п. 6.2.1.2.

6.3. Выявление антигенов *Escherichia coli* O157:H7

6.3.1. Выявление антигенов штаммов *Escherichia coli* O157:H7 в пищевых продуктах

Метод качественного определения антигенов штаммов *E. coli* серотипа O157 в пищевых продуктах с использованием анализатора за 24 ч.

Тесты *E. coli* O157 (ЕСО, ЕСРТ) предназначены для скрининга энтерогеморрагических штаммов *E. coli* серотипа O157 в продуктах питания, образцах производственной среды. На внутреннюю стенку наконечника, используемого в качестве пипетирующего устройства, нанесены антитела к *E. coli* O157. Реактивы, необходимые для анализа, находятся в лунках стрипа. Все этапы анализа выполняются автоматически. Реакционная смесь циркулирует в наконечнике и переносится из лунки в лунку. Часть бульона обогащения вносится в стрип. Присутствующие в нем антигены *E. coli* O157 связываются с антителами на внутренней поверхности наконечника. Несвязанные компоненты удаляются на этапе отмывки. К смеси добавляются антитела, меченные щелочной фосфатазой (конъюгат), и антигены *E. coli* O157, связанные с антителами на внутренней поверхности наконечника, связываются с ними. Несвязанные компоненты конъюгата удаляются при отмывке. На этапе определения осуществляется циркуляция реакционной смеси в лунке, содержащей субстрат (4-метил-умбелиферилфосфат). Фермент катализирует гидролиз субстрата до флуоресцирующего продукта (4-метил-умбелиферона), флуоресценция которого измеряется при 450 нм. На конечном этапе прибор автоматически анализирует полученные значения, сравнивает их с внутренними контрольными значениями (порогами) и выдает результат (положительный, отрицательный).

6.3.1.1. Алгоритм проведения исследования

Навеску продукта, в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие бактерий вида *E. coli* серотипа O157 в соответствии с нормативно-технической документацией на анализируемый продукт, высевают в бульон предварительного обогащения (для молочных продуктов – трипказо-соевый бульон (m-TSB) с акрифлавином; для прочих продуктов – трипказо-соевый бульон (m-TSB) с новобиоцином) в соотношении 1 : 10.

Посевы термостатируют при температуре $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (6 ± 1) ч.

По окончании инкубации перемешивают и переносят 1 мл бульона предварительного обогащения в 9 мл бульона Мак-Конки с цефиксимом и теллуридом калия (СТ-МАС).

Инкубируют (18 ± 1) ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. По окончании инкубации гомогенизируют бульон СТ-МАС. Нагревают (15 ± 1) мин при 95—100 °С, охлаждают, перемешивают и вносят 0,5 мл в лунку для образца на стрипе.

Начинают анализ, как это описано в руководстве пользователя. Полностью автоматизированный анализ завершается приблизительно через 45 мин. После окончания анализа результаты распечатываются автоматически.

6.3.1.2. Интерпретация результатов

Прибор автоматически анализирует полученные значения, сравнивает их с внутренними контрольными значениями (порогами). При пределах значения теста меньше 0,10 результат интерпретируется как отрицательный (Negative), при значении больше или равном 0,10 – как положительный (Positive). Результат теста со значением меньше порогового свидетельствует о том, что образец не содержит антигена O157 или содержит антиген O157 в концентрации ниже порога определения. Результат теста со значением больше или равным пороговому свидетельствует о том, что в образце содержатся клетки *E. coli* O157.

Все положительные результаты теста требуют подтверждения.

Для подтверждения положительного результата возможно:

- использование хромогенного агара chromID™ O157:H7 с цефиксимом и теллуридом (СТ-O157 H7 ID) или агара SMAC CT (Мак-Конки с сорбитом и добавкой для селективного выделения *Escherichia coli*

O157:H7) для высева и инкубации при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18—24 ч с последующей идентификацией колоний;

- использование идентификации на стрипе АРІ типичной колонии;
- использование латексного теста на определение штаммов O157 непосредственно с изолированными колониями (без этапа получения чистой культуры).

6.3.2. Выявление антигенов штаммов *Escherichia coli* O157:H7 в пищевых продуктах и объектах внешней среды

Метод качественного определения антигенов энтерогеморрагических штаммов *E. coli* серотипа O157 в пищевых продуктах, почве, образцах производственной среды с использованием анализатора за 24 ч.

6.3.2.1. Алгоритм проведения исследования

Навеску продукта (образца из внешней среды), в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие бактерий вида *E. coli* серотипа O157 в соответствии с нормативно-технической документацией на анализируемый продукт (образец из внешней среды), стерильно вносят в забуференную пептонную воду (для образцов пищевых продуктов с содержанием антибиотиков в концентрации, указанной в руководстве пользователя, для образцов из внешней среды – нейтрализующий агент натрий тиосульфат), предварительно прогретую до $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ в соотношении 1 : 10.

Посевы термостатируют при температуре $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 6—24 ч.

По окончании инкубации перемешивают и переносят 1—2 мл бульона в пробирку. Нагревают (5 ± 1) мин при $95—100^\circ\text{C}$, охлаждают, перемешивают и вносят 0,5 мл в лунку для образца на стрипе.

Начинают анализ, как это описано в руководстве пользователя. Полностью автоматизированный анализ завершается приблизительно через 50 мин. После окончания анализа результаты распечатываются автоматически.

6.3.2.2. Интерпретация результатов

Прибор автоматически анализирует полученные значения, сравнивает их с внутренними контрольными значениями (порогами). При пределах значения теста меньше 0,04 результат интерпретируется как отрицательный (Negative), при значении больше или равном 0,04 – как

положительный (Positive). Результат теста со значением меньше порогового свидетельствует о том, что образец не содержит клеток O157 или содержит клетки O157 в концентрации ниже порога определения. Результат теста со значением большим или равным пороговому свидетельствует о том, что в образце содержатся клетки *E. coli* O157. Все положительные результаты теста требуют подтверждения.

Варианты подтверждения положительного результата по п. 6.3.1.2.

**Обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах
и объектах окружающей среды методом фермент-связанного
флуоресцентного анализа с применением
автоматического анализатора**

**Методические указания
МУК 4.2.3262—15**

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Н. В. Кожока
Компьютерная вёрстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 7.07.15

Формат 60x84/16

Тираж 350 экз.

Усл. печ. л. 1,2
Заказ 49

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
отделением издательского обеспечения
отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение издательского обеспечения, тел./факс: 8 (495) 952-50-89