МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 14675— 2014

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Руководящие указания по стандартизованному описанию конкурентоспособных иммуноферментных анализов. Определение содержания афлатоксина M_1

(ISO 14675:2003, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2021

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» и Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 534 «Обеспечение безопасности сельскохозяйственной продукции и продовольственного сырья на основе принципов НАССР»

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. № 45)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004--97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004- 97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Институт стандартизации Молдовы
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 августа 2021 г. № 776-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 14675—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2022 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 14675:2003 «Молоко и молочные продукты. Руководящие указания по стандартизованному описанию конкурентного иммуноферментного анализа. Определение содержания афлатоксина M_1» («Milk and milk products — Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays — Determination of aflatoxin M_1 content», IDT).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» Технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO), а также Международной Молочной Федерацией (IDF) в сотрудничестве с AOAC International (Ассоциация Аналитических Сообществ)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 Некоторые элементы настоящего стандарта могут являться объектами патентных прав

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© ISO, 2003
© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2021



В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Введение

Патентованные методы, такие как методы ИФА (иммуноферментные анализы) не могут быть описаны в отдельных стандартах. Поэтому настоящий стандарт предназначен обеспечить руководящие указания по основным параметрам, необходимым для оценки и проверки конкурентного иммуноферментного анализа количественного содержания афлатоксина M_1 в молоке и молочных продуктах.

В настоящее время коммерчески доступными являются несколько количественных иммунохимических способов испытания, основанных на принципах конкурентного иммуноферментного анализа. Однако, поскольку наиболее часто для количественных целей используется способ анализа посредством 96-луночного микротитровального планшета, параметры, приведенные в настоящем стандарте, специально приняты для этого способа, и их применение в полном объеме к другим методикам испытания является необязательным.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Руководящие указания по стандартизованному описанию конкурентоспособных иммуноферментных анализов Определение содержания афлатоксина M_1

Milk and milk products. Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays. Determination of aflatoxin M_1 content

Дата введения — 2022—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования по использованию метода скрининга, применяемого для определения содержания афлатоксина M_1 в молоке и молочных продуктах, основанного на конкурентном иммуноферментном анализе (далее — ИФА).

Для арбитражных целей, положительные результаты иммуноферментного анализа требуют подтверждения принятым эталонным методом. В зависимости от того, соответствует ли испытание требованиям, приведенным ниже, иммуноферментный анализ может быть использован для регулярного контроля качества, особенно когда отсутствие афлатоксина M_1 выше нормативного предела должно быть документировано.

2 Сущность метода

Иммунохимические методы основаны на способности антител связываться со специфическими веществами. Обратимая связь между антителами и их соответствующими антигенами называется иммунологической реакцией. Рассматриваемые связи по прочности являются слабыми межмолекулярными взаимодействиями, такими как кулоновское и ван-дер-ваальсово, а также водородными связями.

Реакция антиген-антитело подчиняется закону действия масс, и количество антигенов или антител, присутствующих в реакционной смеси, может быть выведено с учетом степени протекания реакции.

Качество любого иммуноанализа зависит от иммунохимической основы метода, свойств реагентов, особенностей методики, экспериментальных погрешностей. Эти основные факторы определяют чувствительность, специфичность, точность и достоверность анализа.

Существует различие между конкурентными и неконкурентными методами.

Для практического использования рассматриваемые методы нуждаются либо в меченых антигенах, либо в меченых антителах для наблюдения реакции антиген-антитело.

Конкурентные методы основаны на конкуренции свободных (A_g) и меченых (A_g^*) антигенов по отношению к ограниченному числу антител (антитело-связывающих участков) (AB).

Схематически это иммунохимическое взаимодействие может быть представлено в соответствии со следующим уравнением

$$a\,A_g + b\,A_g^* + c\,AB = d\,A_g\,AB + (c - d)\,A_g^*\,AB + (a - d)\,A_g + (b - c + d)A_g^*.$$

В большинстве случаев, результат испытания представляет собой связанный меченый антиген, но его количественное распределение может быть любым. Для обнаружения низкомолекулярных соединений, таких как микотоксины, которые обладают только одной антитело-связывающей областью

Издание официальное

(эпитопом), обязательным является конкурентный формат анализа. Чтобы обеспечить разделение непрореагировавших компонентов и иммунных комплексов, большинство методов анализа используют либо антитела (прямой конкурентный анализ), либо антиген (непрямой конкурентный анализ), иммобилизованные на твердой фазе иммуносорбента. Таким образом, все реагенты, несвязавшиеся с антителами, могут быть легко удалены промыванием твердой фазы.

3 Иммуноферментный анализ афлатоксина M_1

На основании информации, приведенной в общих иммунологических принципах (см. раздел 2), необходимо, чтобы метод ИФА для афлатоксина M_1 соответствовал требованиям, приведенным в таблице 1.

Таблица 1 — Технические требования к параметрам анализа

Параметр	Техническое условие
Антитела Источник	Поликлональный или моноклональный
Меченый антиген Фермент-маркер Коньюгат	Пероксидаза хрена Афлатоксин B_1- или M_1-оксим-пероксидаза хрена
Формат анализа Иммунохимический метод Способ Время	Конкурентный иммуноферментный анализ 96-луночного микротитровального планшета от 3 ч до 4 ч
Чувствительность анализа Концентрация афлатоксина M_1, дающая относительное поглощение [a]: 80 % 50 %	 < 20 нг/л < 50 нг/л
Специфичность анализа Перекрестная реактивность с афлатоксином M_1 Перекрестная реактивность с другими афлатоксинами (встречающимися в молоке)	 100 % < 20 %
Статистические требования Градуировочные образцы - параллельные определения - число разведений - интервал концентраций (нг/мл) Пробы - параллельные определения - число разведений	 2 или более 6 или более, включая нулевой градуировочный образец от 5 нг/л до 50 нг/л или шире 2 или более по необходимости
Вычисление Аппроксимация градуировочной кривой	Приближение: кубического сплайна, четырехпараметрической логистической модели, линейной регрессии (только линейная часть градуировочной кривой) [b]

Окончание таблицы 1

Параметр	Техническое условие
Точность Градуировочные образцы - коэффициент вариации повторяемости относительного поглощения - коэффициент вариации воспроизводимости относительного поглощения Пробы - предел повторяемости (нг/кг) - предел воспроизводимости (нг/кг) - предел обнаружения (нг/кг) - предел количественного определения (нг/кг)	 < 10 % < 20 % < 100 нг/кг при содержании 200 нг/кг (сухое молоко) < 150 нг/кг при содержании 200 нг/кг (сухое молоко) < 5 нг/кг (молоко) < 10 нг/кг (молоко)
Подготовка проб	Обезжирование путем центрифугирования; восстановление сухого молока в молоко (раствор)
Извлечение	> 80 % в диапазоне от 10 нг/кг до 50 нг/кг (молоко) [c]

[a] (Поглощение градуировочного образца/поглощение нулевого градуировочного образца) × 100.
[b] См. статистические параметры в 6.3.
[c] Коррекция при извлечении обычно не требуется.

4 Чувствительность

Потенциальная чувствительность любого иммунологического анализа напрямую связана со сродством антител к антигенам и может быть рассчитана, если известна константа равновесия [2]. Поскольку реакции антиген-антитело подчиняются кинетическим и термодинамическим закономерностям, время и температура также оказывают влияние на чувствительность анализа.

5 Специфичность

Наряду с чувствительностью, специфичность иммунохимических методов имеет важное значение для выполнения анализа. В принципе, специфическая реакция в области иммунологии может быть определена следующим образом: в присутствии различных молекул специфические антитела должны образовывать комплекс только с одним видом молекул.

Вероятность формирования «неправильного» комплекса определяет специфичность реакции. Специфичность определяется пространственным (трехмерным) соответствием антигена и антитела, а также межмолекулярными взаимодействиями, происходящими между обеими молекулами. При оценке специфичности необходимо рассмотреть структуру антигена, а также гомогенность и гетерогенность антитела.

Препарат антител является гомогенным, если все антитела связываются только с одним и тем же эпитопом, хоть и с разным сродством. Это условие выполняется при применении моноклональных антител, а также антисыворотки против соединений с низкой молекулярной массой (гаптенов). С другой стороны, препарат антител, содержащий различные популяции антител, специфичных для различных эпитопов, является гетерогенным.

На молекулярном уровне истинная перекрестная реактивность наблюдается в случае, по меньшей мере, двух различных антигенов, конкурирующих за один и тот же антитело-связывающий участок. В конкурентных анализах наблюдается истинная перекрестная реактивность при использовании моноклональных антител и (или) антисыворотки против низкомолекулярных соединений. На практике это означает, что в конкурентном анализе достаточно высокая концентрация истинно перекрестно реагирующего вещества дает такой же результат, как «правильное» вещество.

Неспецифические влияния на анализ (например, эффекты матрицы) часто не могут быть отделены от специфического влияния перекрестно реагирующих веществ. В обоих случаях результат анализа одинаков: достигается ложный положительный или ложный отрицательный результат. Однако, в соот-

ветствии с сущностью иммуноанализа, ложноотрицательные результаты конкурентного анализа маловероятны.

6 Статистические параметры

6.1 Общие положения

При обсуждении статистических параметров, характеризующих качество иммунологических анализов, следует отметить, что общие статистические методы для определения предела обнаружения, предела количественного определения, воспроизводимости и других также применимы к иммуноанализу. Существуют некоторые факторы, влияющие на повторяемость и точность результатов иммуноанализа, которые являются особенными для иммуноферментных анализов, проводимых на 96-луночных микротитровальных планшетах.

Для регулярных анализов такими факторами обычно являются число точек для построения градуировочной кривой и число параллельных определений для градуировочных образцов и проб, а также число разведений для каждой пробы.

6.2 Точность

Из факторов, описанных в 6.1, существуют два фактора, которые влияют на точность результата в значительной степени. Первым фактором является положение наблюдаемых значений поглощения на градуировочной кривой. Вторым фактором является число параллельных определений для каждой пробы.

Вследствие нелинейной формы градуировочной кривой показания около 50 % относительного поглощения дают более точные результаты, чем показания около 100 % и 0 % относительного поглощения. Для практических целей результаты должны быть в диапазоне от 20 % до 80 % относительного поглощения.

Очевидно, как и в любых других методах, измерение становится более точным, если число параллельных определений увеличивается.

6.3 Достоверность

Достоверность оценок, в основном, зависит от точности градуировочной кривой. Градуировочная кривая, однако, точно не известна, она оценивается по значениям поглощения градуировочных образцов разных концентраций. Поэтому метод аппроксимации кривой, а также число используемых градуировочных значений и точность концентраций градуировочных образцов определяют точность градуировочной кривой. Среди математических методов, используемых для описания градуировочных кривых иммуноанализа для иммуноферментных анализов, должны быть использованы только четырехпараметрическая логистическая модель и приближение кубического сплайна [2]. Оба метода дают сопоставимые результаты и реализованы в большинстве из доступных программ для обработки данных иммуноанализа.

7 Выводы

Качество иммуноанализа является комплексной функцией, которую сложно описать, некоторые факторы, влияющие на основные параметры качества анализа, приведены в таблице 2 в упрощенном виде.

Таблица 2 — Факторы, непосредственно влияющие на основные параметры качества иммуноферментного анализа

Фактор	Параметр качества анализа			
	Чувствительность	Специфичность	Точность	Достоверность
Иммунохимический - принцип метода Антитело - сродство - специфичность Меченый реагент - активность - коньюгат	да да нет да да	да нет да нет да	нет	нет
Градуировочные образцы - число параллельных определений - число разбавлений Пробы - число параллельных определений - число разбавлений Градуировочная кривая	нет	нет	нет нет да да нет	да да нет нет да
Погрешность эксперимента Подготовка пробы	да да	да да	да да	да да

Примечание — В связи с недостаточной специфичностью, а также возможностью ложноположительных результатов за счет неспецифического ингибирующего действия, подтверждение результатов иммуноанализа по-прежнему необходимо для арбитражных и уставных целей.

Библиография

[1] MÄRTLBAUER E. Basic principles which determine the quality of immunoassays. IDF Special Issue No. 9302, 1993, p. 137 (Базовые принципы, которые определяют качество иммуноанализа.)

[2] RODBARD D., MUNSON P.J. and DE LEAN A. Improved curve-fitting, parallelism testing, characterization of sensitivity and specificity, validation and optimization for radioligand assays. In: Radioimmunoassay and related procedures in medicine. Vol. 1, 1977, pp. 469–514. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1978 (Улучшенное построение кривой, параллельность тестирования, характеристики чувствительности и специфичности, проверка и оптимизация для радиолигандных анализов. В: Радиоиммуноанализ и соответствующие процедуры в медицине.)

УДК 637:006.354 МКС 67.100.10 IDT

Ключевые слова: молоко, молочные продукты, 96-луночный микротитровальный планшет, иммуноферментный анализ, антиген, антитело, проба

Редактор *В.Н. Шмельков*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 25.08.2021. Подписано в печать 20.09.2021. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,18.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru