Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА M_1 В МОЛОКЕ, СУХОМ МОЛОКЕ И СЫРЕ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «RIDASCREEN FAST AFLATOXIN M_1», производства фирмы R-Biopharm AG, Германия

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Издание официальное

Минздрав России
Москва 2004

gost.e-ecolog.ru

Методические рекомендации по экспресс-определению афлатоксина M_1 в молоке, сухом молоке и сыре с помощью тест-системы «Ridascreen Fast Aflatoxin M_1», производства фирмы R-Biopharm AG, Германия. – М., федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. 2004. – 7 с.

1. Разработано: ООО «Стайлаб» (А.В.Галкин); Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (И.В.Брагина, Е.С.Шальнова, И.В.Абарина, Е.И.Богдасарова).

2. Утверждены

3. Вводится впервые.

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач Федерального центра
госсанэпиднадзора Минздрава России,
Председатель Лабораторного совета
Госсанэпидслужбы России

_____ Е.Н.Беляев

«30» ноября 2004

№17ФЦ/3739

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЮ АФЛАТОКСИНА M_1 В МОЛОКЕ, СУХОМ МОЛОКЕ И СЫРЕ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «RIDASCREEN FAST AFLATOXIN M_1»,

производства фирмы R-Biopharm AG, Германия

Настоящие методические рекомендации устанавливают методику экспресс-определения содержания афлатоксина M_1 в молоке, сухом молоке и сыре методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Предел обнаружения афлатоксина M_1:

в молоке и сухом молоке	0,000005 мг/кг;
в сыре	0,00005 мг/л.

1. Общие положения

Афлатоксины принадлежат к канцерогенным, высокотоксичным продуктам жизнедеятельности плесневых грибов рода Aspergillus flavus и Aspergillus parasiticus .

Афлатоксин M_1 является метаболитом афлатоксина B_1 и выделяется с молоком коровы, которой скармливали корма, содержащие афлатоксин B_1.

Афлатоксин M_1 не разрушается при пастеризации молока, поэтому его необходимо контролировать не только в молоке, но и также и в готовых молочных продуктах.

В Российской Федерации СанПиН 2.3.2.1078-02 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» устанавливает предельно допустимые концентрации афлатоксина M_1 0,0005 мг/л (500 ppt) в молоке и 0,00002 мг/л (20 ppt) в продуктах детского питания на молочной основе.

В последнее время в целях скрининга зарубежом в рутинной лабораторной практике широко применяется метод иммуноферментного анализа (ИФА).

Набор Ridascreen Fast Aflatoxin M_1 представляет собой тест-систему для иммуноферментного анализа в комплекте с необходимыми реагентами, выпускается серийно и предназначен для экспресс определения афлатоксина M_1 в молоке, сухом молоке и сыре.

2. Метод измерений

В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами. Поставляемый в комплекте набора планшет сенсибилизирован антителами к афлатоксину M_1. Анализ выполняется следующим образом Исследуемые и стандартные

образцы дозируются в лунки активированного планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы афлатоксина M_1 связываются антителами к афлатоксину M_1 на поверхности планшета. После отмывки планшета в лунки дозируется препарат, содержащий коньюгат афлатоксина M_1 с ферментом. Во время следующей инкубации происходит иммуносорбция на поверхность лунок планшета уже коньюгата к афлатоксину M_1. На очередной стадии промывки из лунок планшета удаляются свободные (не адсорбированные) молекулы коньюгата. После промывки планшета в его лунки дозируется раствор, содержащий субстрат и хромоген. В процессе инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени развития данной цветной реакции, в результате которой хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на ИФА - анализаторе (ридере) при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации афлатоксина M_1 в исследуемых образцах.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

При выполнении измерений массовой концентрации афлатоксина M_1 применяются следующие средства измерения, реактивы, вспомогательные устройства и материалы.

3.1. Средства измерений

Спектрофотометр для ИФА (ридер) с фильтром на 450 нм;
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г ГОСТ 24104
Одноканальные автоматические пипетки, объем дозирования 50 мкл
8-канальные автоматические пипетки на 50 и 250 мкл;

3.2. Реактивы

Тест-система RIDASCREEN FAST Aflatoxin M_1 для иммуноферментного анализа в стандартной комплектации, включая:

Микротитровальный планшет на 96 (12 стрипов по 8 лунок), сенсибилизированный антителами к афлатоксину M_1;

Комплект стандартных растворов афлатоксина M_1 в молочном буфере объемом 1,3 $см^3$, со следующими концентрациями. 0 нг/л (нулевой стандарт), 5 нг/л, 10 нг/л, 20 нг/л, 40 нг/л, 80 нг/л;

Коньюгат афлатоксина M_1 с пероксидазой (красная крышка), объемом 3 $см^3$;

Субстрат (зеленая крышка), содержащий пероксид карбамида, объемом 7 $см^3$;

Хромоген (голубая крышка), содержащий тетраметилбензидин, объемом 7 $см^3$;

Стоп-реагент (желтая крышка), содержащий 1 N раствор серной к-ты, объемом 14 $см^3$.;

Буфер 1 (белая крышка) для разбавления проб, объемом 20 $см^3$;

Буфер 2 (белая крышка) для разбавления коньюгата, объемом 12 $см^3$;

Состав для приготовления моющего буфера: 10 мМ фосфатный буфер (pH 7.4), содержащий 0.05% твина;

Инструкцию по использованию тест-системы на русском и английском языках;

Логарифмическую бумагу;

Дистиллированная (или деионизированная) вода ГОСТ 6709

Только для сыра.

Метанол

Н-Гептан
Дихлорметан
Для приготовления фосфатного буфера:
Дигидрофосфат натрия (×H_2O), 0,55 г
Гидрофосфат натрия (×2H_2O) 2,85 г
Хлорид натрия, 9 г

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Центрифуга эффективностью 3500 g, с центрифужными пробирками;

Колба коническая со шлифом и притертой пробкой на 100 $см^3$ типа КН-1 по ТУ 92-891.029-91;

Пробирки П-2-5-14/23 с притертыми стеклянными пробками;

Воронки лабораторные типа В-36 по ГОСТ 25336;

Фильтровальная бумага «красная лента»;

Пипетки-пастерки;

Лабораторный шейкер (только для сыра);

Испаритель (только для сыра);

Наконечники для автоматических пипеток;

Ванночки для реагентов;

Листовая фильтровальная бумага;

Разовые резиновые перчатки;

Тара для лабораторных отходов.

Замечания по использованию и хранению тест-систем RIDASCREEN FAST:

Не используйте тест-систему с истекшим сроком годности. Срок годности тест-системы указан на этикетке.

Не заменяйте реагенты в составе одного набора реагентами из другого набора с другим номером партии. Не используйте реагенты других производителей. Разбавление или замена реагентов может привести к потере чувствительности определения.

Храните набор при температуре 2-8°С. **НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ НАБОР.**

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в фольгированный пакет вместе с силикагелем (осушителем) и плотно закройте пакет.

Поскольку раствор хромогена светочувствителен. избегайте попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором.

В случае голубоватого окрашивания розового раствора хромогена не рекомендуется использовать раствор, поскольку окрашивание раствора является признаком его порчи.

Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, не превышает 0.6, это также может быть признаком порчи реагентов.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, указанные в технической документации на весы, спектрофотометр и вспомогательные устройства.

4.2. Помещение, в котором производится выполнение измерений, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией.

4.3. **Внимание!** Стандартные растворы содержат токсичный афлатоксин M_1. При работе используйте разовые резиновые перчатки, избегайте контакта реагентов с кожей.

4 4 После каждого анализа следует тщательно промывать оборудование и лабораторную посуду для предотвращения перекрестного загрязнения от пробы к пробе Все использованные материалы, жидкие отходы, расходные материалы и лабораторная посуда должны быть деконтаминированы путем замачивания в течение 30 минут в 5% растворе гипохлорита натрия с последующим добавлением в раствор ацетона 5% по объему и выдерживанием еще 30 минут Для мытья стеклянной посуды, загрязненной афлатоксинами, рекомендуется использовать 10% раствор гипохлорита натрия С помощью раствора соляной кислоты подкислите раствор гипохлорита до pH 7, залейте раствором загрязненную посуду и оставьте в контакте с раствором на ночь Затем лабораторную посуду следует отмыть обычными лабораторными моющими средствами и промыть дистилированной водой

4 5 Стоп-реагент содержит в своем составе серную кислоту Избегайте контакта стоп-реагента с кожеи

5. Требования к квалификации персонала

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или среднее специальное образование, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе стажировки

6. Условия измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия

Температура воздуха	20 - 25 °С,
Атмосферное давление	84 0 - 106 7 кПа (630 - 800 мм рт ст)
Влажность воздуха	не более 80% при температуре 25°С.
Напряжение в сети	220 ± 10 В
Частота переменного тока	50 ± 1 Гц

7. Подготовка к проведению анализа

7.1. Отбор проб

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб Пробы доставляют в лабораторию немедленно после их отбора Пробы, предназначенные для анализа, должны хранится в холодном темном месте

7.2. Подготовка реактивов и материалов

Перед использованием доведите температуру всех реагентов (включая дистиллированную воду) до комнатной (20-25°С) Это займет около 1 часа

Стандартные растворы Стандартные растворы афлатоксина M_1 поставляются готовыми для использования

Микротитровальный планшет Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов вместе с рамкой Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет с силикагелем (осушителем), закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8°С

Приготовление раствора коньюгата Коньюгат афлатоксина M_1 с ферментом (флакон с красной крышкой) поставляется в концентрированном виде Поскольку разбавленный раствор коньюгата имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности Перед разбавлением концентрированного раствора коньюгата осторожно встряхните содержимое флакона Для приготовления готового к использованию раствора коньюгата разбавьте концентрат коньюгата буферным раствором №2, имеющимся в комплекте набора, в отношении 1 10 (например, смешайте 400 мкл концентрата коньюгата с 4 $см^3$ буфера - данного разведения достаточно для 4-х стрипов)

Приготовление моющего буферного раствора Набор содержит пакетик с солью Для приготовления моющего буфера растворите содержимое пакетика в 1 л дистиллированной воды Готовый буферный раствор может храниться при 4°С в течение 4 недель

7.3. Пробоподготовка

7 1 Молоко

7 1 1 Разлейте пробы молока в центрифужные пробирки и центрифугируйте в течении 10 мин при 10°С и ускорении 3500 g При отсутствии в лаборатории центрифуги с охлаждением, перед центрифугированием охладите пробы до 10°С

7 1 2 С помощью пипетки Пастера и резиновой лабораторной груши удалите верхний жирный слой

7 1 3 Для анализа используют 100 мкл снятого молока

7 2 Сухое молоко

7 2 1 Взвесьте 10 г сухого молока и поместите навеску в колбу

7 2 2 Добавьте в колбу 100 $см^3$ дистиллированной или деионизованной воды и перемешивайте раствор в течении 5 мин

7 2 3 Далее следуйте п п 7 1 1 -7 1 3

7 3 Сыр

7 3 1 Представительную пробу сыра следует тщательно растереть и перемешать без добавления жидкости Участки сыра с плесенью следует отделить от пробы, чтобы исключить возможные мешающие влияния на результаты анализ

7 3 2 Поместите 2 г сыра в центрифужную стеклянную пробирку

7 3 3 Добавьте 40 $см^3$ дихлорметана

7 3 4 Встряхивайте пробирку в течение 15 мин

7 3 5 Отфильтруйте суспензию

7 3 6 Испарите 10 $см^3$ экстракта в слабом токе азота при 60°С

7 3 7 Растворите жирный остаток в смеси 0,5 $см^3$ метанола, 0,5 $см^3$ фосфатного буфера, добавьте в пробирку 1 $см^3$ гептана, энергично встряхните

7 3 8 Центрифугируйте в течении 15 мин при 15°С и ускорении 2700 g

7 3 9 Удалите верхний гептановый слой

7 3 10 С помощью пипетки Пастера осторожно отберите нижний водно-метанольный слой

7 3 11 К аликвоте 100 мкл добавьте 400 мкл буфера №1 (разбавление 1 5 до концентрации метанола 10%)

7 3 12 Для анализа используют 100 мкл раствора

8. Выполнение измерений

8.1. Предварительные замечания к проведению измерений с помощью тест-системы RIDASCRIN FAST:

- Немедленно после использования охладите все оставшиеся реагенты до температуры 2 - 8°С, избегайте длительного хранения реагентов при комнатной температуре,
- Иммуноферментная реакция начинается после добавления в лунки планшета препарата антител При дозировании рекомендуется использовать многоканальную пипетку,
- В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания лунок планшета Избегайте перерывов при выполнении анализа,

- Воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. Внимательно следуйте описанной далее процедуре отмывки планшета;
- На всех стадиях инкубации избегайте воздействия прямого солнечного света. Во время инкубации рекомендуется ставить планшет в темное место или прикрывать планшет непрозрачным экраном.

8.2. Проведение измерений

8.2.1. Извлеките из фольгированного пакета необходимое количество лунок - по две лунки на каждую пробу. Поместите лунки в рамку.

8.2.2. Немедленно упакуйте оставшиеся лунки в фольгированный пакет вместе с осушителем и поместите на хранение при 4°С.

8.2.3. Нанесите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов, на разграфленную бумагу как это показано на рисунке (Ст.-стандарты, Пр.-пробы):

Стрип 1	Стрип 2	Стрип 3	Стрип 4	Стрип 5	Стрип 6	Стрип 7	Стрип 8	Стрип 9	Стрип 10	Стрип 11	Стрип 12
Ст.1	Ст.1	Пр.3	Пр.3	Пр.11	Пр.11	Пр.19	Пр.19	Пр.27	Пр.27	Пр.35	Пр.35
Ст.2	Ст.2	Пр.4	Пр.4	Пр.12	Пр.12	Пр.20	Пр.20	Пр.28	Пр.28	Пр.36	Пр.36
Ст.3	Ст.3	Пр.5	Пр.5	Пр.13	Пр.13	Пр.21	Пр.21	Пр.29	Пр.29	Пр.37	Пр.37
Ст.4	Ст.4	Пр.6	Пр.6	Пр.14	Пр.14	Пр.22	Пр.22	Пр.30	Пр.30	Пр.38	Пр.38
Ст.5	Ст.5	Пр.7	Пр.7	Пр.15	Пр.15	Пр.23	Пр.23	Пр.31	Пр.31	Пр.39	Пр.39
Ст.6	Ст.6	Пр.8	Пр.8	Пр.16	Пр.16	Пр.24	Пр.24	Пр.32	Пр.32	Пр.40	Пр.40
Пр.1	Пр.1	Пр.9	Пр.9	Пр.17	Пр.17	Пр.25	Пр.25	Пр.33	Пр.33	Пр.41	Пр.41
Пр.2	Пр.2	Пр.10	Пр.10	Пр.18	Пр.18	Пр.26	Пр.26	Пр.34	Пр.27	Пр.42	Пр.42

8.2.4. Пометьте лунки, чтобы идентифицировать их после промывки.

8.2.5. Осторожно, не допуская вспенивания, перемешайте флаконы с реагентами.

8.2.6. Перед пипетированием смачивайте каждый свежий наконечник пипетки дозируемым раствором (наберите и выпустите раствор).

8.2.7. Добавьте по 100 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок. При каждом дозировании используйте новый наконечник дозатора.

8.2.8. Тщательно перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 - 25°С) в течение 60 мин в темноте.

8.2.9. Вылейте жидкость из лунок. Во избежании появления пленки поверхностного натяжения, препятствующий добавлению промывочного раствора в лунки, переверните рамку планшета, осторожно и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного (не более!) постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой.

8.2.10. С помощью дозатора наполните лунки по 250 мкл моющего буферного раствора и снова вылейте жидкость. Выбейте капельки жидкости как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок еще два раза.

8.2.11. Осторожно, не касаясь лунок, добавьте по 100 мкл готового раствора коньюгата в каждую лунку.

8.2.12. Тщательно перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 - 25°С) в течение 60 мин в темноте.

8.2.13. Вылейте жидкость из лунок. Во избежании появления пленки поверхностного натяжения, препятствующий добавлению промывочного раствора в лунки, переверните рамку планшета, осторожно и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного (не более!) постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой.

8.2.14. С помощью дозатора наполните лунки по 250 мкл моющего буферного раствора и снова вылейте жидкость. Выбейте капельки жидкости как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок еще два раза.

8.2.15. Осторожно, не касаясь лунок, добавьте по 50 мкл субстрата в каждую лунку.

8.2.16. Осторожно, не касаясь лунок, добавьте по 50 мкл хромогена в каждую лунку.

8.2.17. Перемешайте вручную, соблюдая осторожность, и инкубируйте при комнатной температуре (20 - 25°С) в течение 30 минут в темноте.

8.2.18. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента (желтая крышка) и хорошо перемешайте.

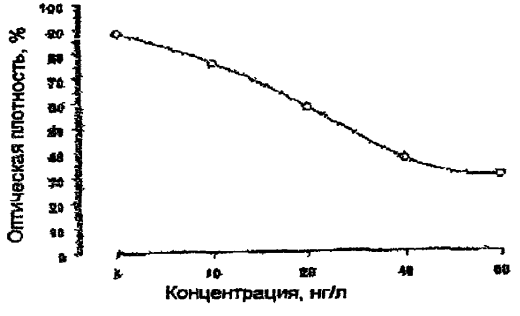
8.2.19. В течение 60-ти минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм относительно воздуха.

9. Обработка результатов измерений

Значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

$$\frac{\textit{Оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\textit{Оптическая плотность лунки с нулевым стандартом}} \times 100 = \%\ \text{поглощения}$$

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации афлатоксина M_1 в нг/кг строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат. Калибровочная кривая должна быть почти линейна в диапазоне 10-40 нг/л (см. рис.1):



Концентрация афлатоксина M_1 в исследуемых растворах в нг/кг считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов Положительные результаты количественного определения концентрации афлатоксина M_1 следует подтверждать с помощью хроматографических методов

Внимание:

Для того чтобы вычислить концентрацию афлатоксина M_1 в исследуемой исходной пробе величину концентрации афлатоксина M_1, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления

При работе в соответствие с настоящей методикой фактор разбавления принимает следующие значения

Молоко/сухое молоко	I
Сыр	I0

Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение, например, РИДА® Софт При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения и рекомендациями разработчика

gost.e-ecolog.ru