



ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1

Тест-система для определения афлатоксина М1
в молоке и молочной продукции методом иммуноферментного анализа

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

РАЗРАБОТАНО
Институт биоорганической химии
НАН Беларуси
ТУ ВУ 100185129.201-2023

Изготовлено в производственной
кооперации с ОДО «КомПродСервис»

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8 °С

Пожалуйста, по вопросам технической поддержки и дополнительной информации обращайтесь к производителю или официальному дистрибьютору на территории Вашей страны:



Официальный дистрибьютор:

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54

Официальный дистрибьютор ОДО "КомПродСервис" в России:

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Тест-система ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1 предназначена для количественного определения содержания афлатоксина М1 в молоке и молочной продукции в целях ветеринарно-санитарной экспертизы и санитарно-гигиенического контроля методом конкурентного иммуноферментного анализа.

1.2 Афлатоксины – высокотоксичные и канцерогенные микотоксины плесневых грибов рода *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*, которые заражают зерновые культуры и продукты их переработки в результате особенностей выращивания и хранения. Афлатоксин В1, наиболее часто встречаемый микотоксин этого класса соединений, при попадании в организм млекопитающих подвергается биотрансформации печеночным микросомальным цитохромом Р-450 в гидроксигированное производное афлатоксин М1. При скармливании зараженного зерна лактирующим животным, таким как дойные коровы, афлатоксин М1 проникает в молоко и загрязняет изготовленную молочную продукцию, что представляет серьезную угрозу для здоровья человека. Так как афлатоксин М1 относительно устойчив при термической обработке, необходим всеобъемлющий контроль не только обрабатываемого сырья, но также и готовых молочных продуктов для его обнаружения. Во многих странах мира существует обязательная система контроля молока и молочных продуктов питания на наличие афлатоксина М1 и установлены максимально допустимые уровни его содержания. В частности, в странах ЕС введены единые нормы для сырого молока, которые составляет 0,05 мкг/л, что отражено в ряде Регламентов и Директив ЕС. В странах таможенного союза и Республике Беларусь эти мероприятия регулируются с учетом требований ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции». Допустимый уровень содержания афлатоксина М1 для молока и продуктов его переработки не должен превышать 0,5 мкг/кг, а для продуктов детского питания на основе молока – менее 0,020 мкг/кг.

1.3 Тест-система рассчитана на проведение анализа 42 исследуемых проб и 6 градуировочных растворов в дубликатах, всего 96 определений. При необходимости тест-система может быть разделена на 2–4 независимые части с различным количеством определяемых проб. Для каждой постановки необходимо построение нового градуировочного графика.

Предел измерений афлатоксина М1 определяется нижним значением величины диапазона измерений: (5,0–80,0) нг/л. Продолжительность анализа составляет 90–100 мин без учета затрат времени на подготовку проб.

2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2.1 В состав тест-системы входят следующие компоненты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Состав тест-системы

Компонент	Количество
1 Иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
2 Градуировочные растворы С ₁ , С ₂ , С ₃ , С ₄ , С ₅ и С ₆ со значениями концентрации афлатоксина М ₁ 0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 нг/л, готовы к использованию	6 флаконов по 1,3 мл
3 Конъюгат, готов к использованию	1 флакон, 12 мл
4 Антитела, готовы к использованию	1 флакон, 12 мл
5 Буфер 1, для разбавления проб	1 флакон, 60 мл
6 Буфер 2, для разбавления проб	1 флакон, 40 мл
7 Промывочный буфер, 10-кратный концентрат	1 флакон, 100 мл
8 Хромоген-субстратный раствор, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
9 Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл

Примечание – В состав тест-системы вместо хромоген-субстратного раствора могут быть включены раствор хромогена ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин), 1 флакон, 0,7 мл, и субстратный буферный раствор, 1 флакон, 14 мл.

2.2 Принцип работы тест-системы. Измерения массовой доли афлатоксина М₁ выполняют методом конкурентного колориметрического иммуноферментного анализа (ИФА). Принцип метода основан на измерении оптической плотности градуировочных растворов и растворов исследуемых проб в ходе проведения ИФА.

На первой стадии анализа в лунки микротитровального планшета (иммуносорбента), покрытого антителами захвата, добавляются специфические антитела к афлатоксину М₁, которые биоспецифически адсорбируются в лунках планшета. После стадий адсорбции антител и промывки добавляют градуировочные растворы и растворы проб анализируемых продуктов, подготовленные к анализу. В результате иммунохимической реакции происходит связывание афлатоксина М₁, присутствующего в растворах, с адсорбированными антителами в лунках. После инкубации и последующей промывки добавляется конъюгат

афлатоксина с пероксидазой хрена, который взаимодействует со свободными связывающими центрами антител с образованием иммунного комплекса, количество которого обратно пропорционально содержанию афлатоксина М1 в пробах. После инкубации несвязавшиеся реагенты удаляются на стадии промывки. Затем добавляется раствор хромогена/субстрата (тетраметилбензидин/перекись водорода) и связанный конъюгат пероксидазы превращает бесцветный хромоген в окрашенный продукт. Колориметрическая реакция останавливается внесением стоп-реагента (раствор серной кислоты), и синий цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность окрашивания измеряется микропланшетным спектрофотометром при длине волны 450 нм.

Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации афлатоксина М1 в градуировочном растворе или в растворе исследуемой пробы. Массовая доля афлатоксина М1 в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием шести градуировочных растворов афлатоксина М1, с учетом фактора разведения.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

3.1 При работе с тест-системой следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

3.2 Необходимо с особой осторожностью обращаться с анализируемыми образцами, экстрактами и стандартами для градуировки, так как они содержат афлатоксин М1, обладающий канцерогенным, мутагенным, тератогенным эффектами.

Хлористый метилен, входящий в состав приготавливаемого экстрагирующего раствора, является сильным ядом. Не допускайте его контактов с кожей и глазами. В случае попадания на тело немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды.

Стоп-реагент содержит серную кислоту и обладает раздражающим действием. В случае попадания на кожу и слизистые оболочки пораженный участок следует немедленно промыть большим количеством проточной воды.

3.3 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 При работе следует надевать халат и одноразовые пластиковые или резиновые перчатки.

3.5 Химическая посуда и оборудование, которые используют при работе с тест-системой, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

3.6 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с тест-системой.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

4.1 Реагенты тест-системы, экстракты проб, градуировочные и другие растворы, применяемые в анализе, необходимо отбирать отдельными наконечниками к пипетке.

4.2 Не допускается использование тест-системы после окончания срока годности.

4.3 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из разных серий данной тест-системы или отдельные компоненты из тест-систем других изготовителей.

4.4 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная стеклянная емкость. Вся используемая стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта хромовой смесью и многократно промыта водопроводной водой и сполоснута дистиллированной водой.

4.5 Необходимо обратить внимание на тщательное, но аккуратное перемешивание содержимого каждого компонента. Во всех случаях следует избегать образования пены.

4.6 Если выполнение ИФА начато, то все последовательные стадии нужно заканчивать, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени и выдерживая установленную продолжительность инкубации. Следует исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

4.7 Во время выполнения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности и не держать компоненты на ярком свете во время инкубации или хранения.

4.8 Поставляемый в составе тест-системы хромоген-субстратный раствор перед использованием должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

4.9 Необходимо использовать микропланшетный фотометр и дозаторы пипеточные переменного объема, поверенные государственной метрологической службой.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 При работе с тест-системой следует использовать следующие средства измерений, оборудование и материалы.

Автоматический микропланшетный фотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, с пределом допускаемой погрешности измерения оптической плотности не более 5%.

Весы лабораторные среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и погрешностью взвешивания не более 0,01 г.

Восьмиканальный дозатор переменного объема (50–300) мкл с погрешностью дозирования не более 3% со сменными одноразовыми наконечниками.

Одноканальные дозаторы переменного объема: (5–50) мкл с погрешностью дозирования не более 5%, (20–200) мкл с погрешностью дозирования не

более 2%, (100–1000) мкл с погрешностью дозирования не более 1,5% со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

Водяная баня, обеспечивающая температуру нагрева (37–60) °С.

Лабораторный встряхиватель (вортекс), диапазон регулирования скорости (0–1800) об/мин.

Гомогенизатор тканей лабораторный или блендер бытовой.

Лабораторный ротатор, обеспечивающий частоту вращения до 60 об/мин.

Центрифуга лабораторная с охлаждением до плюс 10 °С и скоростью вращения до 4000 г (пробирки вместимостью 15 мл).

Роторный испаритель (необходим, если используется при выпаривании).

Магнитная мешалка, частота вращения до 500 об./мин.

Секундомер или таймер.

Термостат, поддерживающий температуру (20–25) °С.

Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру (2–8) °С с морозильной камерой, обеспечивающей температуру не выше минус 18 °С.

Колбы мерные стеклянные вместимостью 100 мл.

Стаканы стеклянные вместимостью 100 мл и 250 мл.

Цилиндры стеклянные вместимостью 10 мл и 50 мл

Пробирки центрифужные вместимостью 15 мл.

Флаконы из пластмассы вместимостью (20–40) мл с завинчивающейся крышкой.

Пробирки стеклянные вместимостью 10 мл.

Пробирки полипропиленовые (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 мл.

Бумага индикаторная универсальная.

Стеклянные емкости с плотно закрывающимися крышками.

Пленка «парафильм», клейкая лента или крышка для микротитровального планшета.

Чашки Петри стеклянные многоцветные диаметр 100мм, высота 15 мм или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки.

Пипетка Пастера.

Шпатель.

Штатив для пробирок.

Перчатки резиновые или пластиковые.

Вода дистиллированная или деионизованная.

5.2 Реактивы, необходимые для пробоподготовки.

Кислота соляная х.ч.

Натрия гидроокись х.ч.

Хлористый метилен, х.ч.

Гексан, х.ч.

Азот газообразный (необходим, если выпаривание производится в токе азота).

Примечание - Допускается применение другого оборудования и реактивов, не уступающих по своим свойствам и качеству приведенным выше.

6 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

6.1 Приготовление 1 М раствора NaOH

Навеску гидроокиси натрия массой 4,0 г, взвешенную с точностью до 0,1 г, помещают в коническую колбу или стакан вместимостью 250 мл. Приливают 35 мл дистиллированной воды, отмеренной цилиндром. После растворения гидроокиси натрия раствор охлаждают до комнатной температуры и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

После приготовления раствора его переносят в полиэтиленовую или фторопластовую посуду и хранят при температуре окружающей среды (20 ± 5) °С не более трех месяцев.

6.2 Приготовление 1 М раствора HCl

В мерную колбу вместимостью 100 мл наливают 50–70 мл дистиллированной воды, затем добавляют отмеренные пипеткой 8,5 мл концентрированной соляной кислоты плотностью 1,18 г/см³. После перемешивания раствора доводят объем до метки дистиллированной водой. При использовании кислоты другой плотности ее объем необходимо пересчитать.

Полученный раствор хранят при температуре окружающей среды (20 ± 5) °С не более трех месяцев.

6.3 Приготовление рабочего промывочного буфера

Содержимое флакона с концентратом промывочного буфера интенсивно встряхивают в течение 10–20 с, в случае образования кристаллов помещают флакон на водяную баню при температуре около 37 °С и выдерживают до полного растворения кристаллов.

Рабочий промывочный буфер готовят в стакане вместимостью 500 мл, разбавляя концентрат промывочного буфера дистиллированной водой в соотношении 1+9.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (2–8) °С – 1 мес.

6.4 Приготовление хромоген-субстратного раствора (если потребуется).

Хромоген-субстратную смесь готовят в темных стеклянных или пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Раствор хромогена разводят субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1+20) из расчета 100 мкл на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 мл вносят необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляют в 20 раз меньшее количество раствора хромогена и интенсивно перемешивают в течение (30–40) С.

Примечание – Субстратный буферный раствор и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.

Приготовленный или поставленный в тест-системе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

7 ОТБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРОБ

7.1 Отбор образцов проводят по СТБ 1036 или и другим ТНПА на конкретные виды продукции.

При необходимости отобранные образцы хранят в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 3 сут или в замороженном виде при температуре не выше минус 20 °С не более 14 сут. Перед проведением подготовки проб замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

7.2 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая при комнатной температуре. Образцы молока в объеме 10 мл отбирают в центрифужные пробирки вместимостью 15 мл, не допуская вспенивания. Далее образцы центрифугируют 10 мин, 4000 g, при 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением необходимо перед центрифугированием выдержать образцы в морозильной камере в течение (10–15) мин, охлаждая их до температуры от плюс 2 °С до плюс 4 °С, контролируя температуру термометром. Не допускается замораживание пробы.

После центрифугирования полностью удаляют верхний жировой слой пипеткой Пастера или шпателем. Затем отбирают аликвоту объемом 1,0 мл обезжиренного молока в чистую пробирку.

Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Полученные растворы проб обезжиренного молока используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре окружающей среды (20±5) °С не более двух часов.

7.3 Подготовка проб сухого молока

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая при комнатной температуре. Взвешивают 10,0 г сухого молока и вносят в стаканы, порциями по 5–10 мл добавляют дистиллированную воду, нагретую до температуры (40±2) °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения сухого молока растворы из стаканов охлаждают

до температуры образца (20–25) °С и количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. После того, как раствор станет комнатной температуры, доводят объем до 100 мл и еще раз перемешивают. До начала анализа оставляют продукт в восстановленном виде минимум на 15 мин. Далее проводят процедуру обезжиривания по п. 7.2.

Для сухого обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Полученные растворы проб обезжиренного молока используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре окружающей среды (20±5) °С не более двух часов.

7.4 Приготовление проб детского питания на основе сухого молока

7.4.1 Восстановление детского питания на основе сухого молока

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая при комнатной температуре. Взвешивают 10,0 г сухой смеси и вносят в стаканы, порциями по 5–10 мл добавляют дистиллированную воду, нагретую до температуры (40±2) °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения сухой смеси растворы из стаканов охлаждают до температуры образца (20–25) °С и количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. После того, как раствор станет комнатной температуры, доводят объем до 100 мл и еще раз перемешивают. До начала анализа оставляют продукт в восстановленном виде минимум на 15 мин.

Полученные растворы проб восстановленной смеси используются для подготовки проб для проведения ИФА. Допускается хранение восстановленной смеси при температуре окружающей среды (20–25) °С не более двух часов.

7.4.2 Подготовка проб к анализу

Отбирают две параллельные пробы объемом 2,0 мл и помещают в полипропиленовые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл. Добавляют в пробирки 8 мл дихлорметана, плотно закрывают пробирки завинчивающимися пробками и перемешивают переворачиванием на ротаторе при 30 об./мин в течение 15 мин при температуре (20–25) °С. Затем пробирки центрифугируют в режиме: 20–25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки полностью удаляют верхний слой пипеткой Пастера или дозатором и отбирают дозатором нижнюю фазу (дихлорметановый экстракт) объемом 4 мл, который переносят в стеклянные пробирки вместимостью 10 мл. Выпаривают досуха дихлорметан из пробирок в токе азота на водяной бане при температуре плюс (50 ±5) °С. Допускается проводить выпаривание на роторном испарителе или выпаривать экстракт досуха в полипропиленовых пробирках для центрифугирования, вместимостью 15 мл, на водяной бане при температуре плюс (60 ±5) °С в вытяжном шкафу. Растворяют осадок в пробирках добавлением 1,0 мл буфера 2. В случае использования роторного испарителя или стеклянных

ных пробирок для выпаривания смесь переносят в центрифужные пробирки вместимостью 15 мл.

Перемешивают содержимое на вортексе при 150 – 200 об./мин в течение 1 мин, после чего добавляют 1 мл н-гексана. Полученную смесь снова перемешивают на вортексе в течение 1–2 мин. Затем пробирки центрифугируют в режиме: 20–25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования полностью удаляют верхний слой гексана пипеткой Пастера или дозатором.

Отбирают аликвоту буферного слоя объемом 0,5 мл в чистые пробирки и используют для проведения ИФА.

7.5 Приготовление проб кефира, сметаны, йогурта

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая при комнатной температуре. При наличии в образцах йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают. Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают.

Взвешивают навеску массой 5,0 г в центрифужной пробирке вместимостью 15 мл и добавляют 5 мл дистиллированной воды. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вортексе и центрифугируют пробы в следующем режиме: 10 °С, 4000 g, 10 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10–15 мин, охлаждая их до температуры от плюс 2 °С до плюс 4 °С, контролируя температуру термометром. Не допускается замораживание пробы. После центрифугирования полностью удаляют верхний жировой слой пипеткой Пастера или шпателем.

Далее отбирают аликвоту обезжиренного раствора в чистую пробирку. Затем переносят обезжиренный раствор объемом 0,2 мл в пробирку и добавляют 0,2 мл буфера 1 для разбавления проб и перемешивают на вортексе. Проверяют рН пробы и при необходимости доводят рН до 7,0–7,5. Подготовленные растворы используют для ИФА.

7.6 Приготовление проб сыра

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая при комнатной температуре. Отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, срезают верхнюю поверхность с признаками плесени, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера или измельчают с использованием терки.

Взвешивают 2,0 г гомогенизированного образца в центрифужных пробирках вместимостью 15 мл. Добавляют в пробирки 8 мл дихлорметана, плотно закрывают пробирки завинчивающимися пробками и перемешивают переворачиванием на ротаторе при 30 об./мин в течение 15 мин при температуре (20–25) °С. После этого пробирки выдерживают на водяной бане при температуре (50 ±5) °С в течение 15 мин, пять или шесть раз интенсивно перемешивая содержимое на вортексе. Затем пробирки центрифугируют в режиме: 20–25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки полностью уда-

ляют верхний слой и отбирают дозатором нижнюю фазу (дихлорметановый экстракт) объемом 4,0 мл, который переносят в стеклянные пробирки вместимостью 10 мл. Выпаривают досуха дихлорметан из пробирок в токе азота на водяной бане при температуре плюс (50 ± 5) °С. Допускается проводить выпаривание на роторном испарителе или выпаривать экстракт досуха в полипропиленовых пробирках для центрифугирования, вместимостью 15 мл, на водяной бане при температуре плюс (60 ± 5) °С в вытяжном шкафу. Растворяют осадок в пробирках добавлением 1,0 мл буфера 1. В случае использования роторного испарителя или стеклянных пробирок для выпаривания смесь переносят в центрифужные пробирки вместимостью 15 мл.

Перемешивают содержимое на вортексе при 150–200 об./мин в течение 1 мин, после чего добавляют 1 мл н-гексана. Полученную смесь снова перемешивают на вортексе в течение 1–2 мин. Затем пробирки центрифугируют в режиме: 20–25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования полностью удаляют верхний слой гексана пипеткой Пастера или дозатором.

Отбирают аликвоту буферного слоя объемом 0,05 мл в чистые пробирки, в которые предварительно добавлено 0,45 мл буфера 1 для разбавления. Полученные пробы используют для проведения ИФА.

7.7 Приготовление проб сливочного масла

Образцы масла сливочного, охлажденные до температуры не более минус 10 °С, измельчают с помощью терки, перемешивают и доводят температуру до $(20–25)$ °С, выдерживая при комнатной температуре.

Из образца отбирают две параллельные навески массой 1,0 г и помещают в полипропиленовые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл. Добавляют в пробирки 8 мл дихлорметана, плотно закрывают пробирки завинчивающимися пробками и перемешивают переворачиванием на ротаторе при 30 об./мин в течение 15 мин при температуре $(20–25)$ °С. После этого пробирки выдерживают на водяной бане при температуре (50 ± 5) °С в течение 15 мин, пять или шесть раз интенсивно перемешивая содержимое на вортексе. Затем пробирки центрифугируют в режиме: 20–25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки полностью удаляют верхний слой и отбирают дозатором нижнюю фазу (дихлорметановый экстракт) объемом 4,0 мл, который переносят в стеклянные пробирки вместимостью 10 мл. Выпаривают досуха дихлорметан из пробирок в токе азота на водяной бане при температуре плюс (50 ± 5) °С. Допускается проводить выпаривание на роторном испарителе или выпаривать экстракт досуха в полипропиленовых пробирках для центрифугирования, вместимостью 15 мл, на водяной бане при температуре плюс (60 ± 5) °С в вытяжном шкафу. Растворяют осадок в пробирках добавлением 1,0 мл буфера 1. В случае использования роторного испарителя или стеклянных пробирок для выпаривания смесь переносят в центрифужные пробирки вместимостью 15 мл.

Перемешивают содержимое на вортексе при 150–200 об./мин в течение 1 мин, после чего добавляют 1 мл н-гексана. Полученную смесь снова переме-

шивают на вортексе в течение 1–2 мин. Затем пробирки центрифугируют в режиме: 20–25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования полностью удаляют верхний слой гексана пипеткой Пастера или дозатором.

Проводят процедуру обезжиривания проб еще раз, добавляя к раствору 1 мл n-гексана. Полученную смесь снова перемешивают на вортексе в течение 1–2 мин и затем центрифугируют в режиме: 20–25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования полностью удаляют верхний слой гексана пипеткой Пастера или дозатором.

Отбирают аликвоту буферного слоя объемом 0,2 мл в чистые пробирки, в которые предварительно вносят 0,3 мл буферного раствора 1. Полученные пробы перемешивают на вортексе и используют для проведения ИФА.

8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

8.1 Перед выполнением ИФА компоненты тест-системы, подготовленные реагенты и исследуемые пробы выдерживают при температуре (20–25) °С в течение 60 мин без доступа света. Перед использованием жидкие реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием, избегая образования пены.

8.2 Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб в микропланшетах согласно таблице 2, с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и раствора пробы требуется две лунки (при исследовании проб в дубликатах).

Таблица 2– Схема расположения лунок

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

Примечания:

1 С₁–С₆ – градуировочные растворы в лунках А–F стрипов №1 и №2, П₁–П₁₀ – растворы проб в лунках G–H стрипов №1 и №2 и в лунках А–H стрипов №3 и №4.

2 Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальную пипетку. Не следует использовать более шести стрипов в одной группе исследований.

8.3 Подготовка иммуносорбента

Планшетный иммуносорбент освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно помещают в фольгированный пакет, заклеивают его клейкой лентой и хранят в холодильнике при температуре (2–8) °С в течение 6 месяцев, но не дольше срока годности тест-системы.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выполняют ИФА согласно приведенной в таблице 4 схеме и описаниям этапов.

9.1 В каждую лунку иммуносорбента вносят отобранные дозатором аликвоты раствора антител объемом 100 мкл. Возможно использование восьмиканального дозатора. Для этого в чашку Петри или пластмассовую кювету вносят антитела в объеме из расчета 0,9 мл на стрип.

Заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре (20–25) °С в течение 15 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет. Не допускается встряхивание или постукивание планшетом по столу.

9.2 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета и удаления жидкости путем энергичного трехкратного постукивания по поверхности стола, покрытой сухой фильтровальной бумагой. Затем с помощью многоканального дозатора проводят 3-кратное промывание планшета: по 250 мкл на одно промывание лунки рабочим промывочным буфером, приготовленным по п.6.3, который предварительно вносят в чистую ванночку в объеме из расчета 6,5 мл на один стрип.

При промывании планшета необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости, не допуская переполнения лунок и перетекания промывочного раствора между ними. Остатки жидкости удаляют, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

Примечание – В процессе работы следует избегать высыхания лунок в перерывах между отдельными этапами работы и увеличения длительности перерывов. Точность результатов измерений зависит от равномерного промывания лунок, поэтому следует тщательно соблюдать процесс промывки. Рекомендуется проводить эту процедуру с помощью устройства для промывки планшетов,

задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – 3, объем используемого промывочного раствора – 250 мкл.

9.3 В лунки промытого иммуносорбента в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 100 мкл градуировочных растворов в порядке возрастания их концентраций и подготовленные растворы анализируемых проб.

Заклеивают планшет пленкой или закрывают крышкой и инкубируют в течение 30 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре (20–25) °С. Не допускается встряхивания или постукивания планшетом по столу. По окончании времени инкубации промывают планшет согласно п. 9.2.

9.4 В каждую лунку промытого иммуносорбента вносят отобранные дозатором алиquotы раствора конъюгата объемом 100 мкл. Возможно использование восьмиканального дозатора. Для этого в чашку Петри или пластмассовую кювету вносят раствор конъюгата в объеме из расчета 0,9 мл на стрип.

Заклеивают планшет пленкой или закрывают крышкой и инкубируют в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре (20–25) °С. Не допускается встряхивания или постукивания планшетом по столу. По окончании времени инкубации промывают планшет согласно п. 9.2.

9.5 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят хромоген-субстратный раствор, поставленный в готовом к использованию виде, или приготовленную в соответствии с п.6.4 хромоген-субстратную смесь в объеме из расчета 1,0 мл на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Аккуратно круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивают содержимое. Заклеивают планшет пленкой или закрывают крышкой и инкубируют в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре (20–25) °С. Отсчет времени инкубации начинают немедленно после окончания внесения этого раствора.

9.6 Останавливают ферментативную реакцию путем добавления во все лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента, предварительно внесенного в чашку Петри или пластмассовую кювету из расчета 1 мл на стрип. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 В течение не более 15 мин после остановки реакции измеряют в планшетном спектрофотометре оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм.

10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Расчеты без использования программного обеспечения

Находят средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих градуировочные растворы и пробы исследуемых образцов продуктов, и определяют процент связывания относительно градуировочного раствора, не содержащего афлатоксин М1:

$$\frac{B_i}{B_1} \cdot 100 \% ; \frac{B_x}{B_1} \cdot 100 \% , \quad (1)$$

где – B_1 – средняя оптическая плотность градуировочного раствора C_1 ;

B_i – средняя оптическая плотность i -го градуировочного раствора ($i = 2,3,4,5,6$);

B_x – оптическая плотность раствора пробы.

Строят градуировочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая по линейной оси ординат значения B/B_1 в процентах, а по логарифмической оси абсцисс – значения концентраций афлатоксина М1, выраженные в нг/л в соответствующих градуировочных растворах.

По градуировочному графику определяют содержание афлатоксина М1 в исследуемых образцах продуктов. При окончательных расчетах следует найденную по градуировочной кривой величину умножить на фактор разбавления пробы, таблица 3.

Таблица 3 – Факторы разбавления

Виды продукции	Фактор разбавления
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное и сухое восстановленное молоко, восстановленное детское питание на основе сухого молока	1
Сыр, молоко сухое (в пересчете на сухой продукт)	10
Масло сливочное	5
Кисломолочные продукты (йогурт, кефир, сметана)	4

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух измерений параллельных проб по формуле:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2} , \quad (2)$$

где – X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой доли афлатоксина М1 в параллельных пробах, нг/кг.

Расчеты выполняют до второго десятичного знака.

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается меньше, чем значение нижней границы диапазона измерений, приведенного в разделе 11, то дается односторонняя оценка содержания афлатоксина М1 в образце в следующем виде.

Для сырого, пастеризованного, стерилизованного, восстановленного сухого молока, восстановленного детского питания на основе сухого молока – менее 5,0 нг/кг.

Для сыра, сухого молока (в пересчете на сухой продукт) – менее 50,0 нг/кг.

Для масла сливочного – менее 25,0 нг/кг.

Для кефира, сметаны, йогурта – менее 20,0 нг/кг.

10.2 Расчеты с использованием программного обеспечения

Обработку результатов измерений можно производить с помощью программного обеспечения “RIDA Soft Win” (R-Biopharm AG, Германия), поставляемого ОДО «КомПродСервис», и при технической помощи официального представителя поставщика.

11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

11.1 Параметры ИФА для градуировочных растворов афлатоксина М1: связывание конъюгата – от 1,0 до 2,8 о.е; B_2/B_1 – от 70 до 95 %, B_6/B_1 – от 5 до 35 %.

11.2 Минимальная концентрация афлатоксина М1 в градуировочных растворах, достоверно измеряемая с помощью тест-системы составляет 5,0 нг/л.

11.3 Специфичность. В тест-системе ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1 используются высокоспецифичные антитела. Относительно афлатоксина М1 (100 %) значения кросс-реактивностей для афлатоксина М 2 – менее 10 %, для афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 – менее 1 %.

11.4 Извлечение (открытие) добавки афлатоксина М1 в холостом образце продукта – не менее 75 %.

11.5 Повторяемость (коэффициент вариации) результатов определения афлатоксина М1 в контрольных пробах различных видов продуктов в одной постановке ИФА не превышает 15 %.

11.6 Воспроизводимость (коэффициент вариации) результатов определения афлатоксина М1 в контрольных пробах различных видов продуктов в нескольких постановках ИФА в нескольких лабораториях не превышает 25 %.

11.7 Пределы количественного определения афлатоксина М1 в молоке и молочных продуктах составляют:


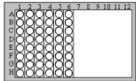












- молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное и сухое восстановленное, восстановленное детское питание на основе сухого молока – 5,0 нг/кг;
- сыр, сухое молоко (в пересчете на сухой продукт) – 50,0 нг/кг;
- масло сливочное – 25,0 нг/кг;
- кефир, сметана, йогурт – 20,0 нг/кг.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

12.1 Тест-систему хранят в упаковке изготовителя при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности, замораживания не допускают.

12.2 Срок годности тест-системы – 12 месяцев от даты изготовления.

Таблица 4 – Схема анализа

Разбавление концентрата промывочного буфера		Разбавить необходимое количество концентрата промывочного буфера дистиллированной водой
<i>Иммуносорбент</i>		
Подготовка иммуносорбента		Вставить необходимое количество стрипов с иммобилизованными антителами захвата
Внесение раствора антител		Добавить по 100 мкл антител в каждую лунку
Инкубация		Выдержать при температуре (20–25) °С в темноте в течение 15 мин
Промывание		Промыть три раза промывочным раствором порциями по 250 мкл на каждую лунку
Внесение градуировочных растворов и растворов исследуемых проб		Добавить по 100 мкл градуировочного раствора или раствора пробы в соответствующую лунку
Инкубация		Выдержать при температуре (20–25) °С в темноте в течение 30 мин
Промывание		Промыть три раза промывочным раствором порциями по 250 мкл на каждую лунку
Внесение раствора конъюгата		Добавить по 100 мкл раствора конъюгата
Инкубация		Выдержать при температуре (20–25) °С в темноте в течение 15 мин
Промывание		Промыть три раза промывочным раствором порциями по 250 мкл на каждую лунку
Внесение хромоген-субстратного раствора		Добавить по 100 мкл в каждую лунку и выдержать 15 мин в темноте при температуре (20–25) °С.
Внесение стоп-реагента		Добавить по 100 мкл в каждую лунку
Измерение оптической плотности		Измерить на микропланшетном фотометре, длина волны 450 нм