
МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
34209—
2017

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Иммуноферментный метод определения плевромутилинов

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2017

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 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 14 июля 2017 г. № 101-П)

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	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 5 октября 2017 г. № 1355-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34209—2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2019 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ИЗДАНИЕ (май 2020 г.) с Поправкой (ИУС 2—2020)

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»

© Стандартиформ, оформление, 2017, 2020



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

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины, определения и сокращения	2
4 Сущность метода	2
5 Предел обнаружения суммарного содержания плевомутилинов	2
6 Требования безопасности и условия выполнения измерений	3
7 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, посуда и реактивы	3
8 Подготовка к выполнению измерений	4
9 Проведение иммуноферментного анализа	5
10 Обработка результатов измерения	7
Приложение А (обязательное) Комплектация тест-системы «Плевомутилины — ИФА»	8
Приложение Б (рекомендуемое) Схема заполнения лунок планшета	9
Приложение В (рекомендуемое) Таблица для записи результатов измерения	10

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Иммуноферментный метод определения плевомутилинов

Feeds, mixed feeds, raw material.
Immunoenzymatic method for determination of pleuromutilins

Дата введения — 2019—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма, комбикорма, комбикормовое сырье и устанавливает иммуноферментный метод определения суммарного содержания плевомутилинов (тиамулина и вальнемулина).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 334 Бумага масштабнo-координатная. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2652 Калия бихромат технический. Технические условия

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.eurasia.org) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **тест-система:** Набор (комплект) специально подобранных реагентов (реактивов) и составных частей, предназначенный для определения одного или нескольких конкретных веществ.

3.1.2 **вспомогательный раствор:** Раствор, приготавливаемый заблаговременно и необходимый для приготовления других типов растворов.

3.1.3 **рабочий раствор:** Раствор одного или нескольких реактивов, приготавливаемый непосредственно перед использованием и необходимый для выполнения процедуры анализа.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

ПМ — плевомутилины;

ВАЛ — вальнемулин;

ТИАЛ — тиамулин;

АГ — антиген;

АТ — антитела;

ИФА — иммуноферментный анализ;

ОП — оптическая плотность;

П — относительное поглощение;

ТМБ — 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин;

ФК — ферментный конъюгат.

4 Сущность метода

4.1 Иммуноферментный метод основан на измерении массовой концентрации ПМ в растворах экстрактов проб с помощью непрямого твердофазного конкурентного ИФА.

4.2 Непрямой твердофазный конкурентный ИФА основан на способности ПМ взаимодействовать со специфичными АТ, полученными против ВАЛ, в условиях конкуренции с белковым конъюгатом ВАЛ, нанесенным на поверхность лунок планшета — твердофазным АГ.

4.3 Связавшиеся с твердой фазой АТ выявляют путем измерения интенсивности окрашивания конечного продукта реакции: вторичных антивидовых АТ, меченных пероксидазой хрена, с субстрат-хромогенной смесью.

Аналитический сигнал (регистрируемое значение ОП), характеризующий степень взаимодействия АТ с АГ, обратно пропорционален массовой концентрации ПМ в растворе.

5 Предел обнаружения суммарного содержания плевомутилинов

5.1 Предел обнаружения суммарного содержания плевомутилинов представлен в таблице 1.

Таблица 1 — Пределы обнаружения суммарного содержания плевомутилинов

Определяемый компонент	Предел обнаружения, мкг/кг
Суммарное содержание ВАЛ и ТИАЛ	100

5.2 Специфичность АТ, применяемых для определения содержания плевомутилинов, выраженная в коэффициентах перекрестного реагирования, представлена в таблице 2.

Таблица 2 — Специфичность АТ, применяемых для определения суммарного содержания плевомутилинов

Определяемый компонент	Коэффициент перекрестного реагирования, %
ВАЛ	100
ТИАЛ	30

6 Требования безопасности и условия выполнения измерений

6.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

6.2 Помещения, в которых проводится анализ и подготовка проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, и соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и электробезопасности по ГОСТ 12.1.019.

6.3 К выполнению измерений допускаются лица, владеющие техникой ИФА и изучившие инструкцию по применению тест-системы и инструкции по эксплуатации используемых приборов.

6.4 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 15 °C до 30 °C;
- относительная влажность воздуха от 20 % до 80 %.

7 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, посуда и реактивы

7.1 При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности $\pm 0,01$ г;
- компьютер с установленным программным обеспечением для управления и обработки результатов измерений;
- фотометр вертикального типа фотометрирования с диапазоном измерений ОП от 0 до 3 в комплекте с интерференционными светофильтрами для длин волн 450 нм;
- мельницу лабораторную;
- калькулятор любого типа с логарифмической функцией;
- систему получения деионизированной воды высокой чистоты;
- термостат любого типа, поддерживающий температуру (37 ± 1) °C;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 2 °C до 8 °C;
- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 4750 об/мин и диапазоном температур от 4 °C до 25 °C, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 см³;
- шейкер вертикального вращения 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об/мин;
- шейкер вихревого типа, с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2500 об/мин;
- шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий поддержание температуры (95 ± 5) °C;
- бумагу масштабнo-координатную по ГОСТ 334, марки Н-1;
- бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
- колбы конические Кн-1—100(250)—24/29 ТС по ГОСТ 25336;
- пипетки многоканальные переменной вместимости 0,03—0,3 см³, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более $\pm 1,0$ %;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 0,005—0,05; 0,1—1,0; 0,5—5,0 см³ с допустимой относительной погрешностью дозирования по карбинолу и ацетонитрилу не более ± 1 %;
- пробирку стеклянную типа П 1-14—120 ХС по ГОСТ 25336;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 см³ с закручивающимися крышками;
- пробирки микроцентрифужные вместимостью 1,5 см³;
- цилиндр 1—100—1 по ГОСТ 1770.

(Поправка.)

7.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы:

- ацетонитрил для ВЭЖХ-МС с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- воду деионизированную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды из дистиллированной воды по ГОСТ 6709;
- калия бихромат по ГОСТ 2652;
- кислоту серную по ГОСТ 4204, концентрированную;

- тест-систему для непрямого твердофазного конкурентного ИФА в комплектации (см. приложение А), предназначенную для определения ПМ;

7.3 Допускается применение других средств измерений, и посуды, не уступающих вышеуказаным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также вспомогательных устройств, реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Подготовка лабораторной посуды и оборудования

8.1.1 При подготовке к проведению измерений лабораторную стеклянную посуду моют смесью водного раствора бихромата калия с концентрированной серной кислотой, многократно промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу.

8.1.2 Подготовку и проверку фотометра проводят в соответствии с руководством по эксплуатации прибора.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление хромовой смеси

В колбе вместимостью 250 см³ взвешивают 5,0 г бихромата калия, растворяют в 50 см³ деионизированной воды, затем добавляют 100 см³ концентрированной серной кислоты.

Срок хранения раствора в вытяжном шкафу при комнатной температуре — не более 1 мес. Если раствор приобретает зеленый оттенок, его готовят заново.

8.2.2 Приготовление рабочего раствора реакционного буфера для промывки

В колбу вместимостью 100 см³ вносят 95 см³ деионизированной воды, добавляют 5 см³ реактива № 2 (см. приложение А), перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

8.2.3 Приготовление рабочего раствора ферментного конъюгата (ФК)

В стеклянную пробирку вносят 2,25 см³ реактива № 10 (см. приложение А) и 0,25 см³ реактива № 9 (см. приложение А), перемешивают на шейкере в течение 10 с.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.3 Отбор проб

8.3.1 Отбор проб кормов, комбикормов, комбикормового сырья производят в соответствии с ГОСТ 13496.0.

8.3.2 Пробы хранят согласно условиям хранения, установленным нормативной документацией на конкретную продукцию.

8.4 Подготовка проб

Пробу измельчают на лабораторной мельнице и проводят ее обработку в соответствии с рисунком 1.

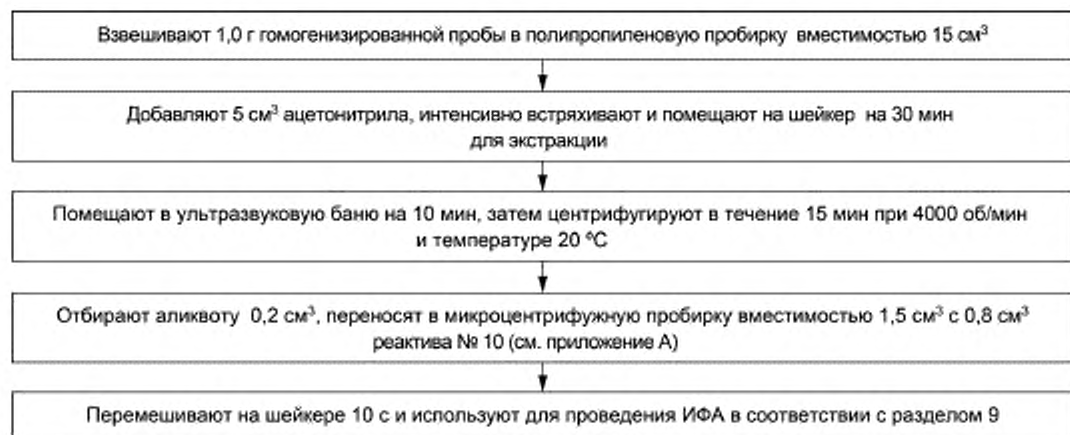


Рисунок 1 — Подготовка проб кормов, комбикормов, комбикормового сырья

9 Проведение иммуноферментного анализа

9.1 Общие положения

9.1.1 При проведении испытаний следует использовать реагенты и компоненты, входящие в один и тот же набор (тест-систему). Разбавление или замена реагентов из набора (тест-системы) другой серии не допускается.

9.1.2 Наборы (тест-системы) следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в пределах срока хранения.

9.1.3 Окрашивание раствора субстрата (приложение А) является признаком его порчи и делает невозможным его применение для анализа.

9.2 Подготовка тест-системы к проведению анализа

9.2.1 Перед использованием тест-систему вынимают из холодильника и выдерживают при температуре (23 ± 5) °С не менее 30 мин, затем аккуратно встряхивают каждый флакон. Реактив № 2 (см. приложение А) необходимо прогреть в термостате при температуре 37 °С до полного растворения кристаллов солей и тщательно перемешать.

9.2.2 После использования реагенты тест-системы сразу убирают в холодильник.

9.2.3 На всех стадиях необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

9.2.4 Для каждого реактива и раствора используют отдельные съемные наконечники пипеток переменной вместимости. Внесение растворов в лунки проводят осторожно, не касаясь наконечниками их дна и стенок.

9.2.5 Каждый исследуемый раствор экстрактов испытуемых проб (см. 8.4) и градуировочных растворов K_0 — K_5 (см. приложение А) анализируют в двух повторностях.

Примечание — Далее приведены расходы реактивов на два стрипа¹⁾, что достаточно для анализа двух проб. Для другого числа проб количество используемых стрипов и смешиваемых объемов реагентов изменяют в соответствии с количеством анализируемых проб.

9.3 Проведение анализа

9.3.1 Из планшета извлекают необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы хранят в закрытом фольгированном полиэтиленовом пакете с зип-локом²⁾ при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности тест-системы.

¹⁾ Стрип — полоска из восьми лунок.

²⁾ Зип-лок — замок, обеспечивающий герметизацию пакета.

9.3.2 Анализ проб и рабочих градуировочных растворов проводят в соответствии с рисунком 2.

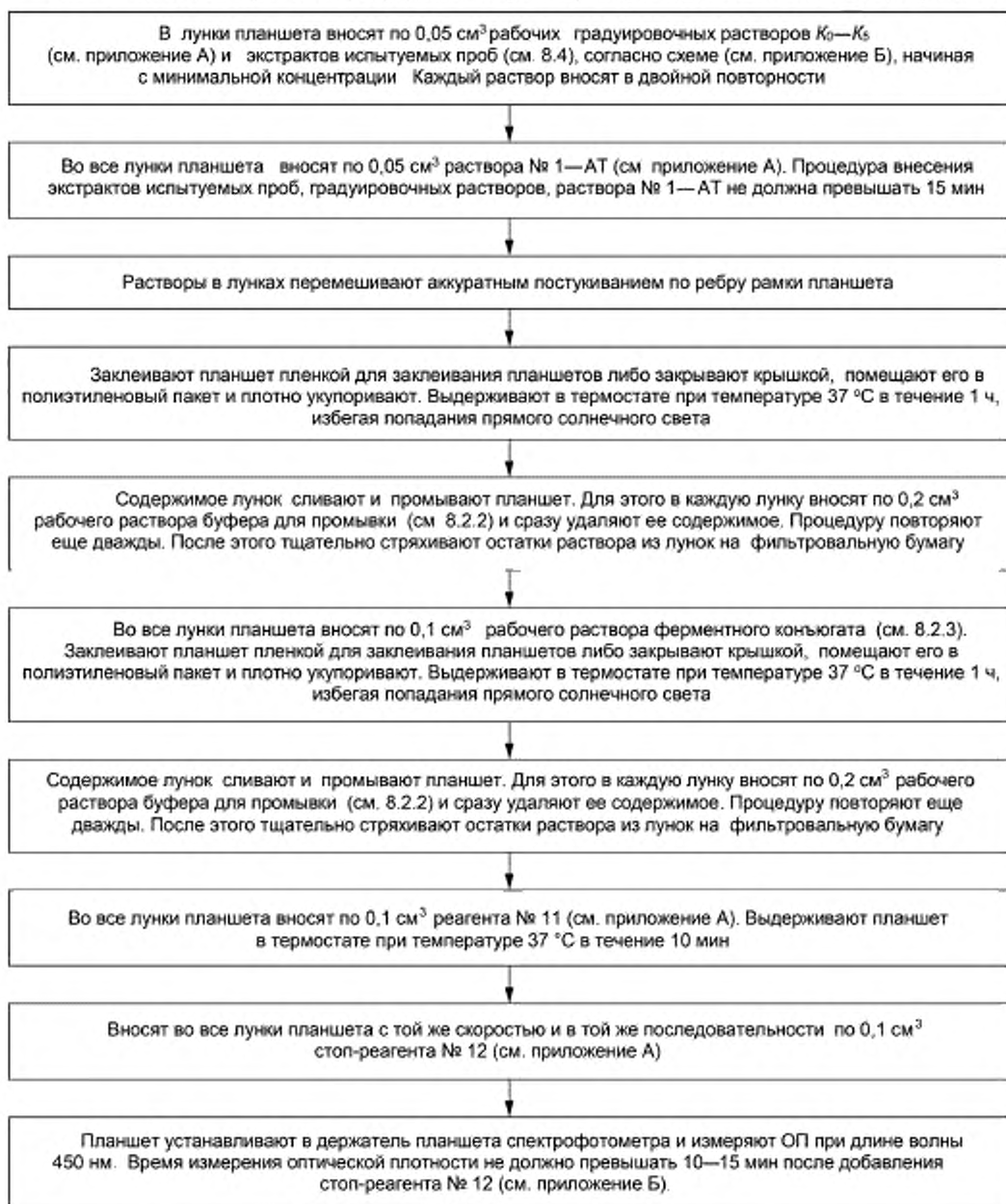


Рисунок 2 — Проведение анализа

10 Обработка результатов измерения

10.1 По показателям ОП в лунках-дублях находят среднеарифметические значения. Разность значений ОП для них в процентах от среднего не должна превышать 10.

Связывание АТ (или относительное поглощение) Π , %, рассчитывают по формуле

$$\Pi = \frac{ОП_k}{ОП_0} \cdot 100, \quad (1)$$

где $ОП_k$ — среднее значение ОП, измеренной в лунках с градуировочными растворами ВАЛ $K_5—K_1$ или экстрактами испытуемых проб;

$ОП_0$ — среднее значение ОП, измеренной в лунках с градуировочным раствором K_0 (приложение А).

По значениям процентов связывания, вычисленным для градуировочных растворов и соответствующим известным значениям массовой концентрации ВАЛ (нг/см³), строят градуировочный график в полулогарифмической системе координат.

10.2 Для построения градуировочного графика используют масштабную-координатную бумагу. На ось абсцисс наносят значения логарифмов концентраций ВАЛ в рабочих разведениях градуировочных растворов $K_5—K_1$ (см. приложение А). По оси ординат откладывают значения процентов связывания, рассчитанные для массовых концентраций по формуле (1) и строят градуировочный график с использованием линейной зависимости.

10.3 С помощью градуировочного графика по значению процента связывания, полученного для растворов экстрактов испытуемых проб, находят логарифм массовой концентрации ПМ. С помощью калькулятора вычисляют его обратное значение (антилогарифм), соответствующее массовой концентрации определяемого ПМ в растворе экстракта.

10.4 Содержание ПМ в испытуемой пробе C , мкг/кг рассчитывают по формуле

$$C = c \cdot K, \quad (2)$$

где c — массовая концентрация ПМ в экстракте испытуемой пробы, определяемая по градуировочному графику, мкг/дм³;

K — коэффициент пересчета мкг/дм³ в экстракте испытуемой пробы в мкг/кг, учитывающий как разведение, так и степень извлечения ПМ и равный 20.

Результаты измерений содержания ПМ, мкг/кг, округляют до целого числа.

Образец записи результатов измерений приведен в приложении В.

10.5 Допускается использование программного обеспечения, позволяющего определять массовую концентрацию (содержание) ПМ в анализируемой пробе со средним значением ОП, измеренным в лунках с градуировочными растворами и экстрактами испытуемых проб.

С помощью компьютерной системы обработки данных строят градуировочную зависимость оптической плотности раствора от массовой концентрации ВАЛ и аппроксимируют линейной функцией.

Градуировочная зависимость считается приемлемой, если рассчитанное программным обеспечением значение коэффициента корреляции R^2 не менее 0,98.

Положительными считают пробы, показавшие значения содержания ПМ выше предела обнаружения (мкг/кг).

Приложение А
(обязательное)

Комплектация тест-системы «Плевомутилины — ИФА»

В комплектацию тест-системы входят:

Планшет 96-луночный полистироловый стрипованный, сенсibilизированный антигеном, готовый для использования

Растворы:

№ 1 — АТ — антитела кроличьи к плевомутилинам, прозрачная опалесцирующая жидкость кремового цвета, готовая для использования, 6,0 см³;

№ 2 — БУФЕР-ОТ — раствор фосфатного буфера с добавлением твина-20 (20-кратный концентрат), значение pH (7,2 ± 0,5) ед. pH, прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 см³;

№ 3—8 — Градуировочные растворы вальнемулина K₀—K₅ с концентрациями 0; 0,5; 2; 4; 16; 48 нг/см³, 1 см³;

№ 9 — Конъюгат антивидовых антител с пероксидазой хрена (10-кратный концентрат), прозрачная бесцветная жидкость, 2,0 см³;

№ 10 — Реакционный буферный раствор с добавлением твина-20 и бычьего сывороточного альбумина, значение pH 7,0—7,4 ед. pH, стерильный, прозрачная бесцветная жидкость, 2-флакона по 20,0 см³;

№ 11 — Раствор субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметил-бензидина с добавлением перекиси водорода, прозрачная бесцветная жидкость, готовая для использования, 11,0 см³;

№ 12 — Стоп-реагент — раствор серной кислоты с молярной концентрацией 0,5 моль/дм³, прозрачная бесцветная жидкость готовая для использования, 11,0 см³.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Схема заполнения лунок планшета

Внесение реагентов следует проводить согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K ₀	K ₀	№ 3	№ 3	№ 11	№ 11	№ 19	№ 19	№ 27	№ 27	№ 35	№ 35
B	K ₁	K ₁	№ 4	№ 4	№ 12	№ 12	№ 20	№ 20	№ 28	№ 28	№ 36	№ 36
C	K ₂	K ₂	№ 5	№ 5	№ 13	№ 13	№ 21	№ 21	№ 29	№ 29	№ 37	№ 37
D	K ₃	K ₃	№ 6	№ 6	№ 14	№ 14	№ 22	№ 22	№ 30	№ 30	№ 38	№ 38
E	K ₄	K ₄	№ 7	№ 7	№ 15	№ 15	№ 23	№ 23	№ 31	№ 31	№ 39	№ 39
F	K ₅	K ₅	№ 8	№ 8	№ 16	№ 16	№ 24	№ 24	№ 32	№ 32	№ 40	№ 40
G	№ 1	№ 1	№ 9	№ 9	№ 17	№ 17	№ 25	№ 25	№ 33	№ 33	№ 41	№ 41
H	№ 2	№ 2	№ 10	№ 10	№ 18	№ 18	№ 26	№ 26	№ 34	№ 34	№ 42	№ 42

Приложение В
(рекомендуемое)

Таблица для записи результатов измерения

Таблица В.1

Маркировка варианта	Значение ОП		$\frac{ОП_{ср}}{ОП_{K_1}}$ 100, %	$ lg , c$	Массовая концентрация (содержание) ПМ	
	по лункам	Среднее			в экстракте, с, мкг/дм ³	в исследуемой пробе, С, (мкг/кг)
K ₁				-0,3	0,5	
K ₁						
K ₂				0,3	2	
K ₂						
K ₃				0,6	4	
K ₃						
K ₄				1,2	16	
K ₄						
K ₅				1,7	48	
K ₅						
№ 1						
№ 1						
№ ...						
№ ...						
№ 41						
№ 41						
№ 42						
№ 42						

УДК 636.085:636.087:006.354

МКС 65.120

Ключевые слова: корма, комбикорма, комбикормовое сырье, плевомутилины, тиамулин, вальнемулин, иммуноферментный метод, тест-система, антиген, антитела, оптическая плотность, ферментный конъюгат

Редактор переиздания *Е.И. Мосур*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *М.В. Лебедевой*

Сдано в набор 08.05.2020. Подписано в печать 20.07.2020. Формат 60×84%. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,60.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

Поправка к ГОСТ 34209—2017 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Иммуноферментный метод определения плевомутилинов

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 7.1, первое перечисление	максимальной нагрузкой не более 150 г и	—

(ИУС № 2 2020 г.)