

МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минсельхозпрод России)

Утверждаю
Заместитель руководителя
Департамент ветеринарии
В.В.Селиверстов

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

№ 13-7-2/1874 от 10.02.2000

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО КОЛИЧЕСТВЕННОМУ
ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГИСТАМИНА В
РЫБЕ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ РИДАСКРИН ГИСТАМИН
(RIDASCREEN® HISTAMIN)

(производство фирмы Ар-Биофарм/R-Biopharm, Германия)

1. Область применения методики

Методика предназначена для количественного определения гистамина в рыбе (скумбрия, ставрида, сайра, макрель, тунец, сельдь, шпрот, лосось и др.) с помощью тест-системы для иммунно-ферментного анализа RIDASCREEN® Histamin*.

* RIDASCREEN® является зарегистрированным товарным знаком фирмы R-Biopharm, Германия

2. Краткое описание методики

Пробоподготовка: Холодное центрифугирование

Затраты времени:

Пробоподготовка
(при обработке 10-ти проб) около 1-го часа

Анализ(независимо от
количества проб) 2 часа

Предел обнаружения: 2.5 мг/кг

Сходимость результата анализа: коэффициент
вариации

не хуже 10 %

Извлекаемость: 80 - 95% (в зависимости от

концентрации гистамина)

Перекрестная чувствительность:

гистамин	100.00%
гистидин	около 0.005 %
спермидин	около 1.0 %
путресцин	около 0.2%

3. Общие положения

Гистамин являются одним из биогенных аминов, образующихся в рыбе при декарбоксилировании аминокислот, в том числе, в результате деятельности бактерий. Поскольку биогенные амины принадлежат к веществам, участвующим в обмене веществ высших животных, они легко метаболизируются и поэтому обычно хорошо переносятся человеком, если их концентрация в пище находится в пределах допустимого уровня.

При бактериальном загрязнении рыбы повышение уровня содержания биогенных аминов, в частности гистамина, может причинить вред здоровью потребителя. При содержании гистамина выше обычного уровня естественный механизм детоксификации аминов за счет деятельности ферментов - аминоксидаз (гистаминазы) уже не справляется. Повышенное поступление гистамина может вызвать так называемую «гистаминовую» мигрень (синдром Хортона), головную боль (невралгия Харриса, характеризующаяся болью в области глаз, лба, височной части головы, слезотечением, воспалением слизистой носа) и другие симптомы, включая тошноту, понос, испарину, повышенное выделение желудочного сока, учащение сердцебиения и снижение диастол ического (нижнего) кровяного давления.

Бактерии *Enterobacteriaceae*, в частности колиформы, обладают высокой декарбоксилирующей активностью, причем даже при стерилизации рыбы наработка гистамина не

прекращается за счет деятельности активных ферментов. Продуктами риска является в первую очередь рыба богатая гистидином, в частности скумбрия, ставрида, сайра, макрель, тунец, сельдь, шпрот, лосось и некоторые другие продукты, например, сыр, мясо, шампанское, вино, пиво и кислая капуста.

Содержание гистамина в пище нормируется во всех развитых странах и является важнейшим показателем свежести рыбы. Так, например, согласно СанПиН 2.3.2.560-96 Российской Федерации содержание гистамина в рыбе не должно превышать 100 мг/кг, в Соединенных Штатах норма гистамина составляет 50 мг/кг (производители рыбных консервов контролируют сырье по норме 5 - 15 мг/кг гистамина).

Традиционный фотоколориметрический метод контроля гистамина в рыбе трудоемок, занимает длительное время и характеризуется малой производительностью. В последнее время в рутинной лабораторной практике широко применяется более удобный иммуно-ферментный метод анализа (ИФА, ELISA), являющийся официальным методом контроля, принятым в странах Евросоюза (Директива 93/257/ЕЕС).

4. Нормативные ссылки

Использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие правила безопасности.

ГОСТ 12.1.018-86 ССБТ. Пожарная безопасность. Электростатическая искробезопасность.

Общие требования.

ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура средств защиты.

ГОСТ 1770-74Е. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры,

мензурки, колбы,
пробирки. Технические условия.
ГОСТ 4025-83. Мясорубки бытовые. Технические условия.
ГОСТ 6709-72. Вода дистиллированная. Технические условия.
ГОСТ 7269-79. Мясо. Методы отбора образцов. Органолептические
методы определения
свежести.
ГОСТ 7328-82Е. Меры массы общего назначения и образцовые.
Технические условия.
ГОСТ 7702.0-74. Мясо птицы. Методы отбора образцов.
Органолептические методы
определения качества.
ГОСТ 24104-88Е. Весы лабораторные общего назначения и
образцовые. Общие
технические условия.
ГОСТ 25336-82. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные.
Типы, основные
параметры и размеры.
ГОСТ 29169-91. Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной
отметкой.
ГОСТ 29224-91. Термометры ртутные стеклянные лабораторные.
Технические условия.
ГОСТ 29227-91. Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки
градуированные. Общие
требования.

5. Сущность метода.

В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с
антителами.

Планшет, входящий в состав набора RIDASCREEN® Histamin,
сенсibilизирован
гистамином. Анализ выполняется следующим образом.

Исследуемые (стандартные) образцы и раствор, содержащий антитела
к гистамину
дозированы в лунки планшета. При инкубации планшета в течение
определенного времени
молекулы гистамина, содержащегося в пробе (в стандартном растворе)
и молекулы гистамина,
адсорбированные на поверхности планшета, конкурируя между собой,

взаимодействуют с
внесенными антителами к гистамину.

После промывки планшета в лунки вносится раствор, содержащий вторичные антитела конъюгированные с пероксидазой, которые во время второй инкубации связываются комплексом гистамин - антитело на поверхности планшета. Несвязанные молекулы конъюгата удаляются при очередной промывке.

В лунки затем дозируется раствор субстрата (пероксид карбамида) и раствор хромогена (тетраметилбензидин). В процессе очередной инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы конъюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. Через определенное время развития цветной реакции, в результате которой бесцветный хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на спектрофотометре (ридере) при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации гистамина в исследуемых образцах.

6. Предел обнаружения и диапазон определяемых концентраций

6.1. Предел обнаружения гистамина составляет:

•2.5 мг/кг при навеске образца 2 г

6.2. Диапазон определяемых концентрация гистамина составляет:

•2.5 - 202.5 мкг/л при навеске образца 2 г

7. Средства измерения, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

7.1. Средства измерения

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104
Меры массы по ГОСТ 7328
Спектрофотометр (ридер), снабженный фильтром на 450 нм
Дозаторы на 50, 100 и 250 мкл
Колба мерная 2-го класса точности вместимостью 1000 мл исп. 2 по ГОСТ 1770
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 мл по ГОСТ 29227

7.2. Вспомогательные устройства

Мясорубка по ГОСТ 4025
Центрифуга охлаждаемая с устанавливаемым ускорением 3000 д
Центрифужная пробирка на 20 мл с завинчивающейся крышкой
Устройство для встряхивания проб
Пипетки Пастера
Пробирки типа П-2-5-14/23 с притертыми стеклянными пробками
Стакан химический вместимостью 100 мл по ГОСТ 25336
Воронки лабораторные типа В-36 или В-75 по ГОСТ 25336
Стеклянный бюкс (стаканчик для взвешивания) по ГОСТ 25336
Груша резиновая
Холодильник бытовой

7.3. Реактивы и материалы

Тест-система для иммунно-ферментного анализа RIDASCREEN®
Histamin в

стандартной комплектации, включая:

Микротитровальный планшет на 48 лунок (6 стрипов по 8 лунок),
сенсibilизированный гистамином 1 шт

Комплект стандартных растворов гистамина в воде со
следующими концентрациями (1 ppb=1мг/кг):

0 ppb (нулевой стандарт), 50 ppb, 150 ppb, 450 ppb,
1350 ppb, 4050 ppb, по 1.2 мл 6 x 1 шт

Конъюгат антител с пероксидазой,
8 мл (красная крышка) 1 шт

Антитела к гистамину, 4 мл (черная крышка) 1 шт

Субстрат, содержит пероксид карбамида,
7 мл (зеленая крышка) 1 шт

Хромоген, содержит тетраметилбензидин,

7 мл (голубая крышка)	1 шт
Стоп-реагент, содержит 1 М раствор серной к-ты, 14 мл (желтая крышка)	1 шт
Буфер, для разбавления конц. растворов конъюгата и антител, 25 мл	1 шт

Твин 20

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Дигидрофосфат натрия, дигидрат, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Гидрофосфат натрия, безводный, Na_2HPO_4

Хлорид натрия, NaCl

Замечания по использованию и хранению тест-системы
RIDASCREEN® Histamin

Не используйте тест-систему с истекшим сроком годности.
Разбавление или замена реагентов может привести к потере
чувствительности
определения.

Не заменяйте реагенты в составе одного набора реагентами из другого
набора с
другим номером партии.

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

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в
сротьгированный пакет
вместе с силикагелем (осушителем) и плотно закройте пакет.
Поскольку стандартные растворы и раствор хромогена
светочувствительны,
избегайте попадания прямых солнечных лучей на флаконы с
растворами.

Признаки порчи реагентов: В случае окрашивания раствора хромогена
не
рекомендуется использовать раствор, поскольку окрашивание раствора
хромогена
является признаком его порчи.

В случае, если величина оптической плотности, измеренной в лунке с
нулевым
стандартом, не превышает 0.6, это также может быть признаком порчи

реагентов.

8. Требования безопасности

8.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.018 и электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, указанные в технической документации на весы, спектрофотометр и вспомогательные устройства.

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

9. Требования к квалификации персонала

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное химическое образование или опыт работы в химической лаборатории, владеющего техникой иммунно-ферментного анализа и освоившего метод в процессе стажировки.

10. Условия выполнения исследований

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

Температура воздуха	20 ± 5 °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

11. Порядок отбора проб и подготовки к проведению исследований

11.1. Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной

документацией по отбору проб.

Пробы доставляют в лабораторию немедленно после их отбора.

11.2. Анализ необходимо начать в день доставки пробы в лабораторию.

При отсутствии

такой возможности допускается хранение образцов не более чем 2

суток с момента отбора при

температуре 2 - 8°C, либо 5-6 месяцев при температуре - 20°C.

11.3. Приготовление вспомогательных растворов.

11.3.1. Приготовление 0.02 М фосфатного буферного раствора ствином, рН 7.2

Взвешивают 2.3 г безводного гидрофосфата натрия, 0.62 г дигидрата дигидрофосфата

натрия и 9.0 г хлорида натрия. Навески переносят в мерную колбу на 1000 мл, добавляют 1 мл

твин-20 и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой.

Раствор тщательно

перемешивают. Срок хранения раствора при температуре 2 - 8°C - 4 дня.

12. Пробоподготовка

12.1. Пробу рыбы измельчают с помощью мясорубки либо другим способом.

12.2. Навеску 2 г фарша и 10 мл 0.02 М фосфатного буферного раствора с твином

переносят в центрифужную пробирку на 20 мл, закрывают пробирку герметичной крышкой и

энергично встряхивают в течение 30-ти минут с помощью устройства для встряхивания проб, либо

вручную.

12.3. Пробирку помещают в центрифугу и центрифугируют при

ускорении 3000 д и

температуре 4°C в течение 10 мин.

12.4. Верхний слой жира удаляется.

12.5. Часть водной вытяжки переносят в чистую пробирку на 5 мл.

12.6. Раствор разбавляют в десять раз фосфатным буферным раствором, например,

переносят дозатором в чистую пробирку 100 мкл водной вытяжки, добавляют 0.9 мл фосфатного буфера и тщательно перемешивают.

12.7. Для анализа используют 50 мкл раствора.

13. Порядок проведения измерений

13.1. Предварительные замечания по проведению измерений с помощью тест-системы RIDASCREEN® Histamin.

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (30 - 40 минут до температуры 18-20 °С).

Немедленно после использования охладите все оставшиеся реагенты до температуры 2 °С.

В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания лунок планшета.

Воспроизводимость результатов иммунно-ферментного 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.

13.2. Подготовка к измерениям

13.2.1. Микротитровальный планшет, сенсibilизированный гистамином

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов.

Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с

силикагелем (осушителем), закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8°C.

13.2.2. Стандартные растворы.

Стандартные растворы гистамина поставляются готовыми для использования в следующих концентрациях:

Стандарт 1	0 ppb
Стандарт 2	50 ppb
Стандарт 3	150 ppb
Стандарт 4	450 ppb
Стандарт 5	1350 ppb
Стандарт 6	4050 ppb

Примечание: 1 ppb = 1 мкг/кг

13.3. Процедура анализа

13.3.1. Вставьте в рамку планшета лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в дубле (по 2 раза). Запишите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов. Пример формы записи приведен на Рис.1.

C1	C1	П3	П3	П11	П11	П19	П19	П27	П27	П35	П35
C2	C2	П4	П4	П12	П12	П20	П20	П28	П28	П36	П36
C3	C3	П5	П5	П13	П13	П21	П21	П29	П29	П37	П37
C4	C4	П6	П6	П14	П14	П22	П22	П30	П30	П38	П38
C5	C5	П7	П7	П15	П15	П23	П23	П31	П31	П39	П39
C6	C6	П8	П8	П16	П16	П24	П24	П32	П32	П49	П49
П1	П1	П9	П9	П17	П17	П25	П25	П33	П33	П41	П41
П2	П2	П10	П10	П18	П18	П26	П26	П34	П34	П42	

Рисунок 1. Пример формы записи координат лунок перед выполнением анализа (С-стандарты, П-пробы).

13.3.2. С помощью дозатора добавьте по 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок.

13.3.3. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл препарата антител (здесь и далее

предпочтительно использование 8-ми канального дозатора, при этом раствор удобно отбирать из специальной ванночки или из чашки Петри). Путем осторожного постукивания по краям планшета перемешайте раствор в лунках и оставьте планшет на инкубацию в темноте в течение одного часа при комнатной температуре.

13.3.4. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку планшета и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполните лунки 250 мкл фосфатного буферного раствора и снова опорожните лунки. Выбейте капельки жидкости как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок еще два раза.

13.3.5. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл препарата конъюгата. Путем осторожного постукивания по краям планшета перемешайте раствор в лунках и оставьте планшет на инкубацию в темноте в течение получаса при комнатной температуре.

13.3.6. Промойте лунки планшета, следуя процедуре по п. 13.3.4.

13.3.7. Добавьте по 50 мкл субстрата и по 50 мкл хромогена в каждую лунку. Тщательно перемешайте и инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте.

13.3.6. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и хорошо перемешайте. В течение 60-ти минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм.

14. Обработка результатов исследования

Средние значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на среднее значение оптической

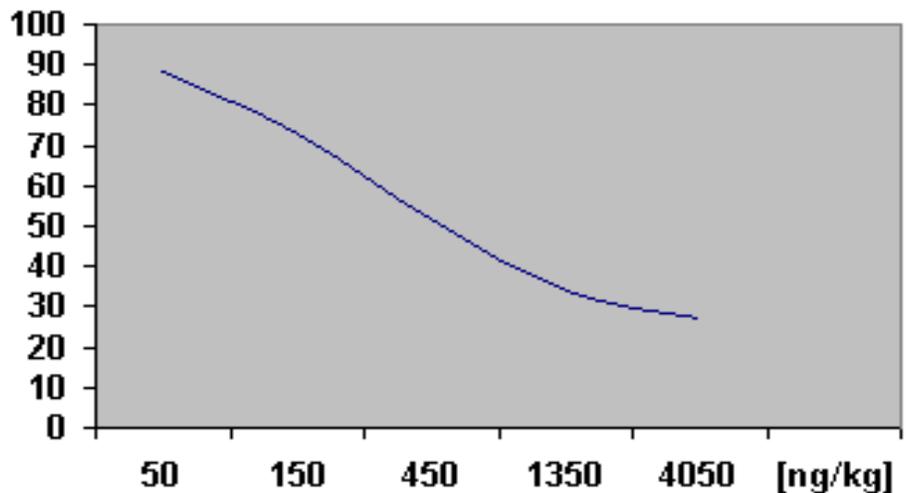
плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:
Средняя оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)

$$\text{X 100} = \%$$

поглощения

Средняя оптическая плотность лунки с нулевым стандартом

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации гистамина в мкг/кг (ppb) строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат. Калибровочная кривая должна быть почти линейна в диапазоне 150 - 1350 мкг/кг (см. Рис. 2).



Концентрация, нг/кг

Рисунок 2. Калибровочная кривая, полученная для тест-системы RIDASCREEN® Histamin

Концентрация гистамина в исследуемых растворах в мкг/кг (ppb)

считывается по

калибровочной кривой соответственно относительному поглощению,

измеренному и вычисленному
для этих растворов.

Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение, например, RIDA®Soft*. При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения.

Внимание: Для того чтобы вычислить концентрацию гистамина в исследуемой исходной пробе, величину концентрации гистамина, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

Фактор разбавления для проб рыбы равен 50.

15. Интерпретация результатов исследования

При контроле проб рыбы на соответствие санитарно-гигиеническим требованиям к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, принятым в Российской Федерации, найденная концентрация гистамина более 100 мг/кг (более 2000 мкг/кг по калибровочной кривой) позволяет рассматривать исследуемую рыбу как несоответствующую санитарно-гигиеническим требованиям.

При меньшем содержании гистамина в рыбе найденная величина концентрации позволяет классифицировать рыбу по уровню свежести.

РАЗРАБОТАНО:

Представитель R-Biopharm в России и
отдела лабораторной
странах СНГ
диагностики Департамента
Директор ООО «СТАЙЛАБ»

Начальник

ветеринарии Минсельхозпрода России

А.В.Галкин

В.И.

Белоусов

Методика апробирована в Центральной научно-методической
ветеринарной

лаборатории Департамента ветеринарии Минсельхозпрода России
(ЦНМВЛ) и во

Всероссийском научно-исследовательском институте мясной
промышленности

(ВНИИМП)

Директор ЦНМВЛ

Заведующая отделом ИФА

В.А. Седов

О.Н.

Виткова

Зав. лабораторией ВНИИМП

Ю.Г. Костенко