

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ № 2 2016
СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК

УДК 573.6.086.83:57.083.3+619.636

*И. И. ВАШКЕВИЧ¹, Т. В. ТЕРЕНТЬЕВА¹, Г. С. КОРНИЛОВИЧ², Л. Н. СУХЕНКО²,
А. И. ШИБЕКО², О. В. СВИРИДОВ¹*

**НОВЫЙ НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АФЛАТОКСИНА В₁ В КОРМАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

¹*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: vashkevich@iboch.bas-net.by,*

²*Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов, Минск, Беларусь,
e-mail: cnilhp@ya.ru*

Разработан и испытан набор реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН для определения микотоксина афлатоксина В₁ в кормах и пищевой продукции методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа в микропланшетном формате. Установленные технико-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню развития иммуноанализа и позволяют с надлежащей точностью определять содержание афлатоксина В₁ в диапазоне от 2,0 до 50,0 мкг/кг в сельскохозяйственной продукции.

Ключевые слова: микотоксины, афлатоксин В₁, иммуноферментный анализ.

I. I. VASHKEVICH¹, T. V. TERENTIEVA¹, G. S. KORNILOVICH², L. N. SUKHENKO², A. I. SHIBEKO², O. V. SVIRIDOV¹

NEW REAGENT KIT FOR ENZYME IMMUNOASSAY OF AFLATOXIN B₁ IN FEEDS AND FOODS

¹*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: vashkevich@iboch.bas-net.by,*

²*Central Research Laboratory of Bakeries, Minsk, Belarus, e-mail: cnilhp@ya.ru*

A reagent kit EIA-AFLATOXIN for the determination of mycotoxin (aflatoxin B₁) in feeds and foods by direct competitive enzyme immunoassay (EIA) has been developed and tested. The evaluated technico-analytical parameters of the kit and metrological characteristics of the measurement technique correspond to the modern level of EIA development and provide the determination of aflatoxin B₁ content in agricultural products in the range from 2.0 to 50.0 µg/kg with proper accuracy and precision.

Keywords: mycotoxins, aflatoxin B₁, enzyme immunoassay.

Введение. Микотоксины, присутствующие в кормах, продовольственном сырье и продуктах питания, могут вызывать различные патологические изменения в организме, представляя угрозу для здоровья человека и животных. Поэтому во многих странах мира существует обязательная система контроля кормов и продуктов на наличие и содержание основных микотоксинов, к которым относятся афлатоксины, зеараленон, фумонизины, токсин Т-2, охратоксин А и дезоксиниваленол [1]. В частности, в странах Европейского союза это отражено в ряде регламентов и директив, таких как 2002/32/ЕС, ЕЕС №1881/ 2006, 2006/576/ЕС и т.д. В Республике Беларусь эти мероприятия регулируются санитарными правилами и гигиеническими нормами, утвержденными Постановлением Минсельхозпрода РБ от 09.06.2009 № 63 и ветеринарно-санитарными правилами обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов (ВСП от 10.02.2011 № 10 в редакции № 33 от 20.05.2011), а также прописаны в нормативных документах Минздрава и Государственного комитета по стандартизации Республики Беларусь.

Для скрининговых исследований содержания микотоксинов в сельскохозяйственной продукции растительного происхождения во всем мире используются наборы реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА) микропланшетного формата. Производители иммуноферментных

наборов для определения микотоксинов представлены на рынке Республики Беларусь в основном компаниями дальнего зарубежья. Так, в настоящее время в нашей стране для количественного определения конкретных микотоксинов в кормах, пищевой продукции и продовольственном сырье практически повсеместно применяются наборы реагентов серии RIDASCREEN[®], производства «R-Biopharm AG» (Германия). Данные наборы имеют микропланшетный формат, рассчитаны на 48 одиночных исследований, включая калибровочные пробы. Применение наборов RIDASCREEN[®] в Республике Беларусь имеет экономические ограничения из-за их высокой цены. В странах СНГ не проводились разработки тест-систем современного технического уровня для определения микотоксинов методом быстрого прямого ИФА, к которым относятся наборы RIDASCREEN[®] и их лучшие мировые аналоги. Отечественные технологии ИФА микотоксинов, как и соответствующие лабораторные тест-системы и коммерческие наборы реагентов отсутствуют.

Сложившаяся ситуация не позволяет осуществлять контроль содержания микотоксинов в сельскохозяйственной продукции на должном уровне и в соответствии с принятыми национальными и международными правилами. Мы поставили цель создать новые конструкции, разработать собственные технологии производства, освоить опытно-промышленный выпуск и осуществить коммерческую реализацию наборов реагентов для количественного определения шести главных микотоксинов в кормах и продовольствии. В данной публикации описаны разработка и свойства набора реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН.

Материалы и методы. Чистый афлатоксин В₁, гемигидрохлорид (аминоокси)уксусной кислоты, диизопропилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид, детергеннты и бактериостатики приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Очищенная пероксидаза из корней хрена (ПХ) поступила от фирмы «Диаэм» (РФ). Разборные микропланшеты из полистирола, состоящие из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), куплены у «Greiner bio-one» (Германия). Моноклональное антитело (МАт) к афлатоксину и хромоген-субстратный раствор (3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в смеси с органическим пероксидом) получены от ООО «ИЛ Тест-Пушино» (РФ). Индивидуальные хромоген (раствор ТМБ) и субстрат (раствор Н₂О₂), а также стоп-реагент (раствор Н₂SO₄) поступили от УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

В экспериментах применяли воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм·см⁻¹, очищенную в модульной установке Water Pro Plus (Labconco, США). Для детекции колориметрического сигнала в ИФА использовали приборы АИФ М/340 (Беларусь). Спектры ультрафиолетового поглощения растворов афлатоксина В₁ и его производных снимали в кювете с длиной оптического пути 1 см в приборе Specord M 40 («Carl Zeiss», Германия).

Ферментный конъюгат афлатоксина В₁ получали через промежуточный О-карбоксиметил-оксим, как описано ранее для стероидов [2]. К раствору афлатоксина В₁ (порядка 15 мкмоль) в абсолютном метаноле в два приема добавляли около 60 мкмоль пирролидина и после выпадения осадка вносили 30 мкмоль гемихлорида аминоксиуксусной кислоты и перемешивали при 50–60 °С, наблюдая исчезновение осадка и обесцвечивание раствора. После отгонки растворителя остаток растворяли в воде с рН 8,0 (при необходимости применяли обработку ультразвуком) и очищали несколькими экстракциями бензолом. Карбоксиметил-оксим микотоксина высаждали из водного раствора доведением рН до 2 концентрированной соляной кислотой и затем несколько раз экстрагировали порциями этилацетата. Такой же экстракции этилацетатом подвергалась после высушивания и растворения в воде бензольная фаза. Все этилацетатные экстракты объединяли и экстрагировали 1 М NaOH, водный слой промывали этилацетатом. Щелочной раствор подкисляли соляной кислотой до рН 2 и экстрагировали этилацетатом. Органический слой собирали, промывали водой до нейтрального рН, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали. Конечный продукт при необходимости очищали с помощью ВЭЖХ на колонке с С₁₈, используя смесь вода–ацетонитрил (90:10) в качестве подвижной фазы. Затем к раствору карбоксиметил-оксима афлатоксина В₁ (около 5 мкмоль) в диоксане добавляли около 6 мкмоль N-гидроксисукцинимид в диоксане и порядка 6 мкмоль диизопропилкарбодиимида также в диоксане. Перемешивали на водяной бане, а затем при комнатной температуре. Осадок

диизопропилмочевины отфильтровывали. Далее получали целевые конъюгаты микотоксинов с пероксидазой из корней хрена (ПХ), не выделяя активированные эфиры карбоксиметилосимов из фильтратов, путем прибавления к ним раствора чистой пероксидазы в бикарбонатном буфере с рассчитанной концентрацией фермента. Продукты очищали гель фильтрацией на колонке PD-10 Desalting Column (General Electric Healthcare). Содержание остатков микотоксина в конъюгате афлатоксин-ПХ определяли путем дифференциальной спектрофотометрии, используя $\epsilon_{350} \sim 20\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для афлатоксина В₁. Очищенные конъюгаты переводили в 50 %-ный глицерин и хранили при $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Микропланшетный иммуносорбент получали биоспецифической иммобилизацией или пассивной (физической) адсорбцией МАт в лунках. В первом случае полистирольную поверхность лунки предварительно покрывали авидином, а МАт модифицировали производным биотина [3] и использовали в количествах 10–100 нг на лунку. Для простой адсорбции брали немодифицированное МАт в количествах 100–200 нг на лунку. Для стабилизации иммобилизованного МАт применяли специальные растворы, содержащие инертные для анализа белки, неорганические соли, сахара и антибактериальные добавки.

В состав готового набора ИФА-АФЛАТОКСИН входят следующие компоненты:

- иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, с иммобилизованным МАт, готов к использованию, 1 планшет;
- планшет для смешивания, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, 1 планшет;
- градуировочные растворы афлатоксина В₁, жидкие препараты, 5 флаконов, $0,7 \pm 0,02$ мл. Массовая концентрация афлатоксина В₁ в диапазоне 0; 0,2–10 нг/мл (с учетом фактора разведения при пробоподготовке соответствует массовой доле афлатоксина В₁ в пробах 0; 1–50 мкг/кг или ppb);
- конъюгат афлатоксин-ПХ, жидкий препарат, 1 флакон, $12,0 \pm 0,5$ мл;
- промывочный раствор, 11-кратный концентрат, жидкий препарат, 1 флакон $30,0 \pm 0,5$ мл;
- хромоген-субстратный раствор, жидкий препарат, 1 флакон, $12,0 \pm 0,5$ мл;
- стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон, $15,0 \pm 0,5$ мл.

Если при подготовке набора к работе предусматривается приготовление хромоген-субстратной смеси, то компонентами набора являются раствор ТМБ, 1 флакон $0,7 \pm 0,02$ мл и субстратный буферный раствор, 1 флакон, $14,0 \pm 0,5$ мл.

В кратком изложении методика применения набора ИФА-АФЛАТОКСИН состоит в следующем. Образец корма или пищевого продукта размалывают на мельнице типа «Циклон» и просеивают через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм. Точную навеску (5,0 г) размолотого образца экстрагируют 25 мл смеси метанол–вода в объемном соотношении 70:30, фильтруют, доводят рН до значения 6–8, и раствор используют для проведения ИФА в течение 2 ч. В лунки планшета для смешивания восьмиканальным дозатором вносят по 100 мкл конъюгата афлатоксин-Пх, а затем вносят в дубликатах по 50 мкл каждого градуировочного раствора и растворов двух параллельных проб каждого исследуемого образца. Немедленно после перемешивания отбирают восьмиканальным дозатором и вносят в лунки микропланшетного иммуносорбента по 100 мкл градуировочных растворов и растворов проб вместе с конъюгатом. Закрытый иммуносорбент инкубируют в течение 20 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от 20 до 25 °С. По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок и с применением восьмиканального дозатора проводят 5-кратное промывание планшета рабочим промывочным раствором порциями по 200 мкл на одно промывание каждой лунки, выдерживая заполненные лунки не менее 10 с. Далее в каждую лунку промытого планшета-иммуносорбента восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрытый планшет инкубируют в течение 5 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от 20 до 25 °С. По истечении времени инкубации в каждую лунку планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл стоп-реагента и перемешивают растворы

в лунках круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола. В течение не более 15 мин после добавления стоп-реактанта измеряют оптическую плотность в каждой лунке на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм.

Обработка результатов измерений проводится с применением разработанного к набору шаблона в формате Microsoft Excel. В соответствующие графы шаблона вносят полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов C_0-C_4 и растворов исследуемых проб. Компьютерная программа автоматически рассчитывает параметры связывания конъюгата афлатоксин-ПХ иммобилизованным МАт для градуировочных растворов C_1-C_4 и для раствора неизвестной пробы относительно градуировочного раствора C_0 , строит градуировочную зависимость и рассчитывает массовую долю афлатоксина V_1 в пробе, C_x , мкг/кг (ppb).

Метрологические характеристики методики выполнения измерений массовой доли афлатоксина V_1 набором реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН получены на основании экспериментальных данных в ходе внутрилабораторных испытаний с использованием образцов зерна злаковых и масличных культур (пшеница, рожь, овес, тритикале, ячмень, кукуруза, соя, рапс), продуктов их переработки (мука, мучки, отруби), жмыхов, шротов и комбикормов. При этом концентрации микотоксина находились в начальном, среднем и конечном отрезках градуировочной кривой, что соответствовало 2,8; 5,9; 16,8; 19,2; 30,0; 44,9 мкг/кг (ppb). Подготовленные образцы анализировались в условиях повторяемости в лаборатории с изменяющимся фактором: «время+оператор». Показатели прецизионности и правильности определяли соответственно по СТБ ИСО 5725-3 и СТБ ИСО 5725-4, а оценки неопределенности делали, как описано в руководствах [4, 5].

Результаты исследований и их обсуждение. Афлатоксины – это метаболиты плесневых грибов *Aspergillus flavus* Link и *Aspergillus parasiticus* Speare, развивающиеся на разнообразных объектах растительного (зерно, орехи, семена зернобобовых и масличных культур, продукты их переработки) и животного происхождения (колбасы, ветчина, сыр, сухое молоко и др.) [6]. По относительной токсичности афлатоксины располагаются в следующий ряд: $V_1=M_1>G_1>>V_2$ и G_2 . В США действует ограничение по общему (суммарному) содержанию афлатоксинов, а в Евросоюзе регламентируется содержание афлатоксина V_1 . В Беларуси установлены предельно допустимые уровни содержания афлатоксина V_1 в зерне и продуктах его переработки, зернобобовых, масличных культурах, комбикормах для сельскохозяйственной птицы, крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей и прудовых рыб – 0,02 мг/кг, в комбикормах для свиней, жмыхах и шротах – 0,05 мг/кг, в комбикормах для сеголеток и кормах для непродуктивных животных – 0,01 мг/кг, в комбикормах для форели – 0,005 мг/кг, а также регламентируется допустимая концентрация суммы афлатоксинов в зерне и зернобобовых – 0,02 мг/кг [7]. Строение афлатоксина V_1 представлено на рис. 1. Этот 6-метоксицифурокумарон имеет молекулярную массу 312 г/моль, широкий пик УФ-поглощения в области 360 нм с коэффициентами экстинкции в ацетонитриле $\epsilon = 20700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и метаноле $\epsilon = 21500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, а пик голубой флуоресценции приходится на 425 нм.

В настоящее время разработаны и используются методы гетерогенного прямого (иммобилизованные на твердой фазе антитела и меченный ферментом антиген в растворе) [8, 10, 11] и непрямого (твердофазный антиген и растворенные антитела) [12, 13] конкурентного ИФА для определения афлатоксина V_1 с применением поликлональных [8–12] или моноклональных [9, 13] антител.

Набор реагентов «ИФА-АФЛАТОКСИН» основан на принципе прямого конкурентного ИФА. Микотоксин экстрагируют из размолотого образца раствором метанол : вода = 70:30. В лунки планшета для предварительного смешивания вносят конъюгат афлатоксина V_1 с ПХ и добавляют градуировочные растворы афлатоксина V_1 с известной концентрацией и подготовленные к анализу растворы проб. Во время последующей инкубации в планшетном иммуносорбенте конъюгат афлатоксин-ПХ

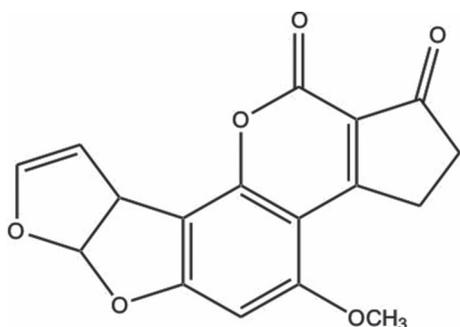


Рис. 1. Структурная формула афлатоксина V_1

в составе градуировочного раствора или исследуемой пробы конкурирует за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами компоненты, к системе добавляют хромоген-субстратный раствор, который позволяет визуализировать реакции антиген–антитело. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации афлатоксина В₁ в анализируемом образце или градуировочном растворе. Затем добавляют стоп-реагент, останавливающий цветную реакцию и одновременно изменяющий цвет окраски. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на микропланшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. По результатам измерений оптической плотности градуировочных растворов с известным содержанием афлатоксина В₁ строится градуировочная зависимость, с помощью которой определяется массовая доля афлатоксина В₁ в анализируемых образцах.

Базовым компонентом набора ИФА-АФЛАТОКСИН является разборный пластмассовый микропланшет (иммуносорбент), лунки которого покрыты специфическим МАт к афлатоксину. Лунки служат функционализированными контейнерами, в которых протекают иммунохимические реакции и процессы колориметрической детекции. Выбранные высококачественные формованные изделия из полистирола и способ их покрытия МАт, обеспечивают хорошую воспроизводимость результатов и стабильность иммуносорбента в условиях анализа и длительного хранения.

Градуировочные пробы как компоненты разработанного набора – это растворы на основе стабилизированных водно-органических сред с точными концентрациями афлатоксина В₁, проверенными по международным стандартам и независимыми физико-химическими методами.

Конъюгат антигена с ферментом представляет собой бифункциональное химическое соединение на основе афлатоксина В₁ и ПХ, имеющее высокие и стабильные показатели специфического сродства к иммобилизованному МАт и энзиматической активности в составе специального стабилизирующего раствора.

К вспомогательным компонентам в системе ИФА-АФЛАТОКСИН относятся: промывочный раствор, хромоген-субстратная смесь и стоп-реагент. Промывочный раствор – специально подобранная смесь минеральных солей и детергентов для удаления избыточных количеств компонентов иммунохимической реакции и обеспечения высокой специфичности анализа. Хромоген-субстратная смесь – химические соединения, индифферентные в подобранных условиях совместного хранения, но взаимодействующие в ходе ферментативной реакции на заключительной стадии анализа с образованием продуктов, высокочувствительная детекция которых обеспечивается регистрацией колориметрического сигнала в видимой области спектра многоканальным планшетным спектрофотометром. Стоп-реагент – разбавленная Н₂SO₄ в нужной концентрации, останавливающая ферментативный процесс с изменением окраски продуктов реакции и фиксацией ее на уровне и во времени, которые оптимальны для надежной детекции. Типичный градуировочный график представлен на рис. 2.

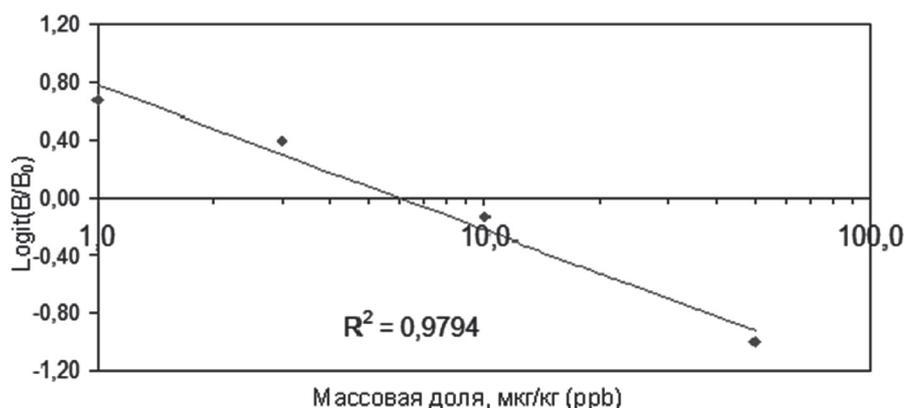


Рис. 2. Типичный градуировочный график набора реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН

В табл. 1 приведены значения технико-аналитических параметров набора реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН, усредненные по результатам независимых ИФА, которые были выполнены в ходе внутрилабораторных испытаний опытной партии набора. Установленные в результате испытаний технико-аналитические показатели набора ИФА-АФЛАТОКСИН соответствуют ТУ ВУ 100185129.135-2015 и общим требованиям качества иммуноанализа, что обеспечивает количественное определение афлатоксина В₁ в сельскохозяйственной продукции.

Т а б л и ц а 1. Техничко-аналитические параметры набора ИФА-АФЛАТОКСИН

Наименование показателя	Предписанное значение	Полученное значение
Соотношение В ₀ , В ₁ , В ₂ , В ₃ , В ₄ ¹ , о.е.	В ₀ > В ₁ > В ₂ > В ₃ > В ₄	В ₀ > В ₁ > В ₂ > В ₃ > В ₄
В ₀ , о. е.	1,3–2,7	1,45
В ₄ , о.е., не более	0,3	0,1
В ₁ /В ₀ , %	70–95	84,0
В ₄ /В ₀ , %	5–30	6,0
Чувствительность ² , нг/мл, не более	0,2	< 0,2
50% интерсепт ³ , мкг/кг (ppb), в пределах	3,8–8,0	5,2
Коэффициент вариации ⁴ , %, не более	15	4,2

П р и м е ч а н и я: ¹В₀–В₄ – оптические плотности растворов в лунках, содержащих градуировочные растворы с увеличивающейся концентрацией афлатоксина В₁, (С₀–С₄) соответственно, измеряемые в оптических единицах (о.е.).

²Минимальная массовая концентрация афлатоксина В₁, определяемая набором, которая рассчитана на основании удвоенного значения среднего квадратичного отклонения от среднего арифметического значения В₀.

³Массовая доля афлатоксина В₁ при 50 %-ном связывании от В₀, полученная в результате измерения градуировочных растворов.

⁴Для результатов определения массовой концентрации афлатоксина В₁ в лунках, содержащих градуировочный раствор С₃.

Определение метрологических характеристик методики выполнения измерений содержания афлатоксина В₁ в кормах и комбикормах набором реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН проводилось в соответствии с существующими требованиями и действующими правилами. В табл. 2 приведены полученные относительные значения показателя повторяемости σ_r , показателя промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$ с изменяющимся фактором «время+оператор», предела повторяемости r , предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(TO)}$ и относительной расширенной неопределенности U измерений массовой доли афлатоксина В₁ в кормах при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Т а б л и ц а 2. Метрологические характеристики методики выполнения измерений с использованием набора ИФА-АФЛАТОКСИН

Диапазон измерений, мкг/кг	σ_r , %	$\sigma_{I(TO)}$, %	r , %	$r_{I(TO)}$, %	U , %
2,0–50,0	7	11	20	31	32

П р и м е ч а н и е. Предел измерений определяется значением величины нижней границы диапазона измерений.

Из данных табл. 2 следует, что разработанная методика обеспечивает получение результатов измерений массовой доли афлатоксина В₁ с надлежащими параметрами точности.

З а к л ю ч е н и е. Разработанный набор реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН имеет современную конструкцию, основан на принципе конкурентного связывания определяемого и меченного ферментом афлатоксина В₁ со специфическим МАт, иммобилизованным в 96 лунках разборного микропланшета, содержит эффективные вспомогательные реагенты и дает возможность исследовать 43 образца на содержание афлатоксина В₁. Техничко-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню ИФА и требованиям контроля безопасности пищевых продуктов питания и кормов. Изделие устойчиво при хранении и применении в обычных лабораторных условиях.

Список использованной литературы

1. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems / Task Force Report. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, USA. – 2003. – N 139. – P. 199.
2. Janoski, A. H. Selective 3-(O-carboxymethyl)oxime formation in steroidal 3,20-diones for hapten immunospecificity / A. H. Janoski, F. C. Shulman, G. E. Wright // *Steroids*. – 1974. – Vol. 23. – P. 49–64.
3. Дубовская, Л. В. Биоспецифический метод детекции биотинилированных иммуноглобулинов / Л. В. Дубовская, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім навук*. – 2008. – № 1. – С. 84–88.
4. Руководство ЕВРАХИМ / СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях; под общ. ред. Л. А. Конопелько. – СПб.: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева, 2002. – 149 с.
5. VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data. LGC (Teddington) Ltd. – 2000. – 87 p.
6. Stoloff, L. Incidence, distribution and disposition of products containing aflatoxin / L. Stoloff // *Proc. Amer. Phytopathol. Soc.* – 1976. – Vol. 3. – P. 156–172.
7. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов: утв. постановлением М-ва сельск. хоз-ва и продовол. Респ. Беларусь 10.02.2011. – № 10.
8. Pestka, J.J. Quantitation of aflatoxin B₁ and aflatoxin B₁ antibody by an enzyme-linked immunosorbent microassay / J. J. Pestka, P. K. Gaur, F. S. Chu // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1980. – Vol. 40. – P. 1027–1031.
9. Production and characterisation of polyclonal and monoclonal antibodies against aflatoxin B₁ oxime–BSA in an enzyme-linked immunosorbent assay / C. M. Ward [et al.] // *Mycotoxin Res.* – 1990. – Vol. 6. – P. 73–83.
10. Application of immunoaffinity chromatography and enzyme immunoassay in rapid detection of aflatoxin B₁ in chicken liver tissues / J. K. Gathumbi [et al.] // *Poultry Science*. – 2003. – Vol. 82. – P. 585–590.
11. AFB1-AP conjugate for enzyme immunoassay of aflatoxin B1 in corn samples / D. Neagu [et al.] // *Analytical Letters*. – 2009. – Vol. 42. – P. 1170–1186.
12. Иммуноферментная тест-система определения афлатоксина В₁ / А. А. Буркин [и др.] // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2000. – Т. 36. – С. 93–97.
13. Сравнительная иммунохимическая характеристика поликлональных и моноклональных антител к афлатоксину В₁ / М. А. Буркин [и др.] // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2000. – Т. 36. – С. 575–581.

Поступила в редакцию 15.12.2015