Нитрофуран AHD ИФА

5091AHD [7]12.20

Иммуноферментный метод для скрининга и количественного определения нитрофурана AHD в различных матрицах

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

Официальный дистрибьютор 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

Официальный дистрибьютор в Беларуси:
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

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Тест-набор для ИФА нитрофурана AHD является конкурентным иммуноферментным анализом для количественного анализа нитрофурана AHD в различных матрицах. С помощью ИФА-набора может быть проведено 96 анализов. Пробы и градуировочные растворы измеряются в повторностях, что означает, что с помощью набора может быть проведен анализ 40 проб.

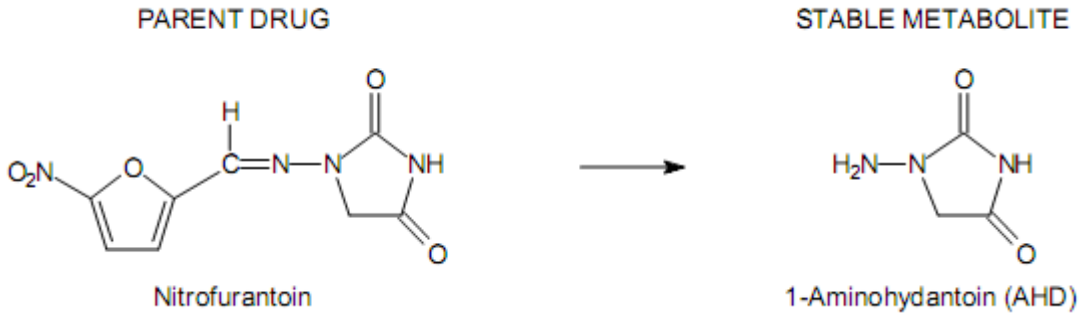
Тест-набор для ИФА нитрофурана AHD содержит все реагенты, необходимые для проведения анализа. Реагенты для подготовки проб не входят в состав тест-набора.

1. ВВЕДЕНИЕ

Нитрофураны представляют собой группу синтетических антибиотиков широкого спектра действия, которые широко и эффективно используются для профилактики и лечения желудочно-кишечных инфекций, вызванных Escherichia coli, Salmonella spp., Mycoplasma spp., Coccidia spp., колиформами и другими простейшими в животноводстве и аквакультуре. Помимо этого, нитрофураны используются в качестве стимуляторов роста в животноводстве.

Четырьмя основными нитрофуранами являются фуразолидон, фуралтадон, нитрофурантоин и нитрофуразон. Они запрещены в ЕС в качестве ветеринарных препаратов из-за их токсичности и предполагаемых канцерогенных и мутагенных свойств (Положение Комиссии 1442/95). В 2003 году окончательный MRPL (минимальный требуемый предел обнаружения для тест-наборов) был установлен на уровне 1 нг / г (мкг/кг) в ЕС для всех четырех вышеупомянутых нитрофуранов в птице и аквакультуре (Решение Комиссии 2003/181 / ЕС).

Различные исследования показали, что исходные молекулы нитрофурана быстро метаболизируются у животных и их стабильность in vivo не больше нескольких часов. В результате образуются стойкие остатки, связанные с белком. В отличие от исходных молекул эти белковые метаболиты стабильны и устойчивы в организме. Данные остатки можно освободить от белков путем кислотного гидролиза. Исследование на наличие нитрофуранов, таким образом, эквивалентно исследованию на наличие в составе части исходной молекулы, т.е. свободного остатка. Остатки нитрофурана обнаруживаются после введения фуралтадона (3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинона = AMOZ), фуразолидона (3-амино-2-оксазолидинона = AOZ), нитрофурантоина (1-аминогидантоина = AHD) и нитрофуразона (семикарбазида = SEM).



2. ПРИНЦИПЫ ИФА НИТРОФУРАНА AHD

Тест-набор для проведения ИФА AHD включает предварительно сенсибилизированный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок). AHD, маркированный пероксидазой хрена, градуировочные растворы либо растворы проб вносятся в лунки планшета. Свободный нитрофуран AHD, присутствующий в пробе либо градуировочном растворе, и ферментно маркированный AHD конкурируют за центры связывания антител (конкурентный ИФА).

После инкубации в течение 30 минут несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки. Количество связанного ферментно маркированного AHD визуализируется внесением смеси субстрат/хромоген (тетраметилбензидин). Связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в окрашенный продукт.

Реакция окрашивания останавливается внесением серной кислоты. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм, она обратно пропорциональна концентрации нитрофурана AHD в пробе.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного тест-набора ИФА используются мышиные антитела к нитрофурану AHD, конъюгированному белком.

Перекрестная чувствительность:

AHD 100%
AOZ < 0.01%
SEM < 0.01%
AMOZ < 0.01%

Предел обнаружения определен при оптимальных условиях. Граничные значения необходимо рассматривать критически.

Матрица	Описание подготовки проб	Предел обнаружения мкг/кг
Молоко	8.1	0,2
Мед	8.2	0,5
Яйца	8.3	0,2
Яичный порошок	8.4	0,2
Креветки	8.5	0,2
Ткани	8.6	0,2
Рыба	8.7	0,2
Печень	8.8	0,2
Моча	8.9	0,2

4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Набор реагентов должен храниться при температуре от +2˚С до +8˚С в темном месте. Для дробного использования набора компоненты должны храниться при условиях, описанных в разделе 9.
- После истечения срока годности невозможно гарантировать приемлемое качество.
- Планшет должен быть согрет до температуры окружающей среды перед вскрытием упаковки, чтобы избежать появления конденсата.
- Все реагенты должны быть приготовлены непосредственно перед использованием, но после доведения до комнатной температуры.
- Раствор субстрат/хромоген может храниться в холодильнике (+2ºС - + 8ºС) до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор хромогена.

Следующие показатели могут являться признаком порчи реагентов:

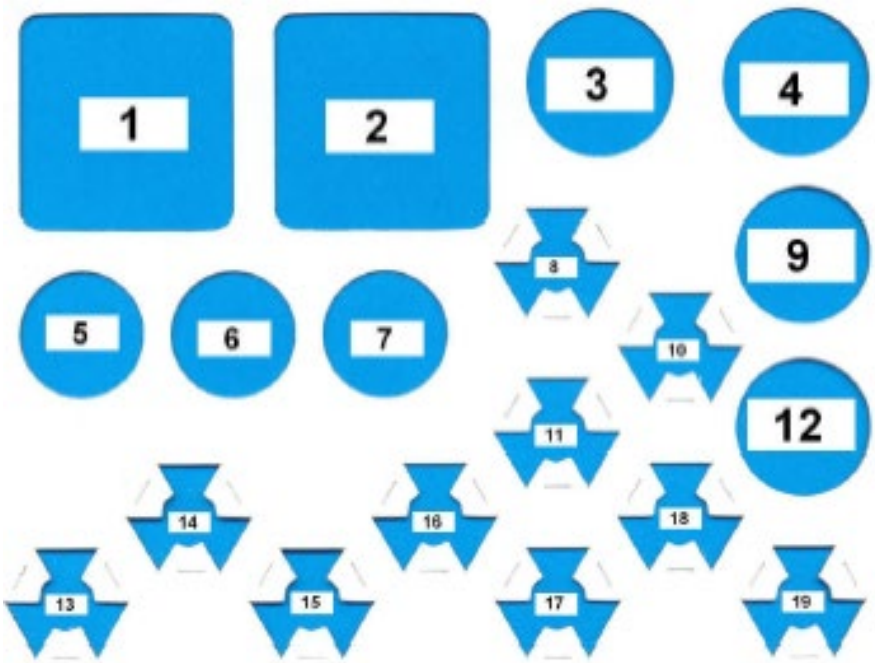
- Голубая окраска раствора хромогена перед внесением в лунки
- Слабая либо отсутствующая реакция окрашивания нулевого градуировочного раствора (Е450 нм < 0,8)

5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок), сенсибилизированный антителами. Планшет готов к использованию.

Позиции реагентов в наборе. Для приготовления реагентов смотрите раздел 9.



1. **Буфер для разведения проб** (40 мл, готов для применения)
2. **Буфер для промывки планшета** (30 мл, концентрат 20х)
3. **Раствор субстрата** (12 мл, готов для применения)
4. **Стоп-реагент** (15 мл, готов для применения)
5. **Раствор конъюгата** (100 мкл, концентрации 100х)
6. **Спайк-раствор AHD** (1 мл концентрации 100 нг/мл для приготовления спайков)
7. **Нулевой градуировочный раствор** (2 мл, готов для применения)
8. **Градуировочный раствор 1** (1 мл, готов для применения) 0,0625 нг/мл AHD
9. **Градуировочный раствор 2** (1 мл, готов для применения) 0,125 нг/мл AHD
10. **Градуировочный раствор 3** (1 мл, готов для применения) 0,25 нг/мл AHD
11. **Градуировочный раствор 4** (1 мл, готов для применения) 0,5 нг/мл AHD
12. **Градуировочный раствор 5** (1 мл, готов для применения) 1,0 нг/мл AHD
13. **Градуировочный раствор 6** (1 мл, готов для применения) 2,0 нг/мл AHD
14. **Буфер для разведения** (15 мл, готов для применения)
15. не используется
16. не используется
17. не используется

6. ОБОРУДОВАНИЕ И ТРЕБУЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ТЕСТ-НАБОРА

- стеклянные пробирки объемом 4 мл
- пробирки с закручивающейся крышкой объемом 15 мл
- весы
- вытяжной шкаф
- перчатки
- гомогенизатор (вортекс, миксер)
- центрифуга (2000g)
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100-300 мкл
- шейкер для микротитровальных планшетов
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм
- стеклянные пробирки объемом 10-15 мл
- пипет-дозаторы 100-1000 мкл
- степпер
- алюминиевая фольга либо парафильм

- дистиллированная вода
- этилацетат
- диметил сульфоксид (DMSO)
- н-гексан
- 1 M HCl
- 2-нитробензальдегид
- 0,25 M K_2HPO_4 (43.5 г/л дистиллированной воды)
- 1 M NaOH (40 г/л дистиллированной воды)

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Нитрофураны являются токсичными. Избегать контакта с кожей и слизистыми. Избегать вдыхания нитрофуранов.
- Стоп-реагент содержит серную кислоту концентрации 0,5 М. Не допускать контакта реагента с кожей.
- Избегать контакта с кожей и слизистыми.
- Не пипетировать ртом.
- Не допускается есть, пить, курить, хранить или готовить пищу или применять косметику в пределах обозначенной рабочей области.
- Используйте реагент для дериватизации в вытяжном шкафу, чтобы избежать вдыхания паров.
- Тетраметилбензидин является токсичным при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании. Поэтому будьте внимательны при работе с субстратом.
- Не используйте компоненты тест-набора после истечения их срока годности и не перемешивайте компоненты из разных партий.
- Каждая лунка используется как оптическая кювета. Поэтому не прикасайтесь к поверхности лунок, не допускайте их повреждения и загрязнения.
- Все компоненты должны быть полностью растворены перед применением. Обращайте особое внимание на субстрат, который имеет тенденцию к кристаллизации при температуре +4˚C.
- Оптимальные результаты могут быть получены при строгом соблюдении протокола анализа. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования и равномерного промывания лунок.

8. ПОДГОТОВКА ПРОБ

Каждая матрица требует проведения процедуры дериватизации, каждая лаборатория должна проводить собственную валидацию процедуры анализа. Для всех видов нитрофуранов и матриц мы рекомендуем оптимальную концентрацию реагента для дериватизации и оптимальное время в соответствии с валидацией, проведенной в нашей лаборатории, что указанно в инструкции. Данные концентрации и время являются рекомендуемыми и могут изменяться лабораториями для получения оптимальных результатов.

Дериватизация

8.1. Молоко

- Центрифугировать холодные пробы молока в режиме 10 мин / 2000g / 4ºC.
- Удалить шпателем верхний жировой слой. Для дериватизации используется проба обезжиренного молока объемом 1 мл.

Дериватизация

- Тщательно перемешать 1 мл пробы гомогенизированного обезжиренного молока с 4 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 1 M HCl и 200 мкл реагента для дериватизации* в 15мл пробирке для центрифугирования.
- Осторожно перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 1 минуты (при слишком сильном встряхивании экстракт становится желеобразным).
- Инкубировать при температуре 37ºC в течение 1 часа.

8.2 Мед

- Перемешать 1 г пробы меда с 4 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 1 М HCl и 100 мкл реагента для дериватизации* в 15 мл пробирке для центрифугирования.
- Осторожно перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение прим. 5 минут до полного растворения меда.
- Инкубировать при температуре 37ºC в течение 1 часа.

8.3 Яйца

- Перемешать 1 г гомогенизированной пробы яиц с 4 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 1 М HCl и 100 мкл реагента для дериватизации* в 15мл пробирке для центрифугирования.
- Осторожно перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 1 минуты (при слишком сильном встряхивании экстракт становится желеобразным).
- Инкубировать при температуре 37ºC в течение 1 часа.

8.4 Яичный порошок

- Поместить 1 г яичного порошка в пробирку, добавить 5 мл воды, перемешать до получения гомогенного раствора.
- Перемешать 1 г гомогенизированной пробы с 4 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 1 М HCl и 100 мкл реагента для дериватизации* в 15 мл пробирке для центрифугирования.
- Осторожно перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 1 минуты (при слишком сильном встряхивании экстракт становится желеобразным)
- Инкубировать при температуре 37ºC в течение 1 часа.

8.5 Креветки

- Перемешать 1 г гомогенизированной пробы креветок с 4 мл бидистиллированной воды, 0,85 мл 1 М HCl и 250 мкл реагента для дериватизации* в 15 мл пробирке для центрифугирования.
- Перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 5 минут
- Инкубировать при температуре 37ºC в течение 1 часа либо при 37ºC в течение 3 часов либо при 37ºC в течение ночи.

8.6 Ткани

- Перемешать 1 г гомогенизированной пробы мяса (мышц) с 4 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 1 М HCl и 200 мкл реагента для дериватизации* в 15 мл пробирке для центрифугирования
- Перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 5 минут.
- Инкубировать при температуре 37ºC в течение 1 часа либо при 37ºC в течение 3 часов либо при 37ºC в течение ночи.

8.7 Рыба

- Перемешать 1 г гомогенизированной пробы рыбы с 4 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 1 М HCl и 250 мкл реагента для дериватизации* в 15 мл пробирке для центрифугирования.
- Перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 5 минут
- Инкубировать при температуре 37ºC в течение 1 часа.

8.8 Печень

- Перемешать 1 г гомогенизированной пробы печени с 4 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 1 М HCl и 250 мкл реагента для дериватизации* в 15 мл пробирке для центрифугирования.
- Перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 5 минут.
- Инкубировать при температуре 37ºC в течение 1 часа.

8.9 Моча

- Центрифугировать пробы в режиме 5 мин / 2000g.
- Перемешать 1 г гомогенизированной пробы креветок с 4 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 1 М HCl и 100 мкл реагента для дериватизации* в 15 мл пробирке для центрифугирования.

- Перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 5 минут.
- Инкубировать при температуре 37ºС в течение 1 часа.

*Реагент для дериватизации

10 мМ 2-нитробензальдегид в диметилсульфоксиде (DMSO)

Раствор должен готовиться непосредственно перед использованием, напр. развести 15.2 мг 2-нитробензальдегида в 10 мл диметилсульфоксида.

Примечание: 2-нитробензальдегид является чувствительным к окислителям. Поэтому следует избегать контакта с воздухом либо иными аналогичными окислителями. Упаковка должна храниться плотно закрытой. Не использовать реагент по истечении срока годности.

Процедура экстракции

- Добавить к дериватизированной пробе 2,5 мл 0,25 М K2HPO4 , 0,4 мл 1 М NaOH и 5 мл этилацетата.
- Тщательно перемешать пробу путем переворачивания вверх-вниз в течение 1 минуты (при слишком сильном встряхивании экстракт становится желеобразным).
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 2000g.
- Перенести 2,5 мл верхней фазы (этилацетатной фазы) в 4 мл стеклянную пробирку.
- Выпарить досуха при 50ºС в слабом токе азота.
- Растворить сухой остаток в 1 мл н-гексана. Добавить 1 мл буфера для разведения проб.
- Перемешать на вортексе в течение 1 минуты.
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 2000g.
- Удалить верхнюю гексановую фазу.
- При отсутствии разделения фаз следует нагреть пробу в течение 3 минут при температуре 80-100ºС.
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 2000g.
- Для постановки ИФА использовать 50 мкл водной фазы.

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (20 - 25°С). Неиспользуемые реагенты должны быть немедленно помещены в оригинальную упаковку на хранение при +2˚С–+8˚С.

Микротитровальный планшет

Не требуемые стрипы должны храниться с осушителем в плотно закрытом оригинальном пакете при температуре 2 - 8 °С.

Буфер для промывки

Буфер для промывки поставляется в концентрации 20х. Буфер необходимо приготовить непосредственно перед использованием. На один стрип необходимо 40 мл разведенного раствора (2 мл концентрата буфера + 38 мл дистиллированной воды).

Буферы для разведения

Данный тест-набор включает 2 буфера для разведения, оба готовы к использованию: буфер для разведения конъюгата (разд. 5 п.9) и буфер для разведения проб (разд. 5 п.1)

Конъюгат (100 мкл)

Конъюгат поставляется в концентрированном виде (100х). Центрифугированием (в течение 1 минуты при 1000g) обеспечивают стекание концентрата на дно виалы. 10 мкл концентрата конъюгата разводят в 1 мл буфера для разведения. На 2 стрипа по 8 лунок требуется 800 мкл раствора конъюгата. Не требуемый концентрат конъюгата должен сразу же быть помещен в темное холодное место (+2°С - +8°С).

Раствор субстрата/хромогена

Раствор субстрата/хромогена (готовый к применению) осаждается при температуре +4˚С. Бутылочку с ним необходимо довести до комнатной температуры (в темноте) и перемешать содержимое перед внесением в лунки.

10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Протокол промывки

При ИФА между каждым этапом иммунологической инкубации должны удаляться несвязанные компоненты. Это достигается посредством соответствующей процедуры промывки. Очевидно, что каждая процедура промывания должна проводиться с большой тщательностью для гарантирования хороших результатов повторяемости и воспроизводимости.

В принципе, промывка вручную или с помощью автоматического вошера может осуществляться следующим образом:

Промывка вручную

1. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.
2. Все лунки заполняют буфером для промывания до края лунки (300 мкл)
3. Этот процесс промывки (этапы 1 и 2) повторяют трижды.
4. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета
5. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.
6. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

Промывание с помощью автоматического вошера

При использовании автоматического вошера проверьте, чтобы из всех лунок жидкость удалялась полностью, чтобы раствор для промывания тщательно распределялся, заполняя до края каждую лунку во время каждого цикла промывания. Вошер должен быть запрограммирован на выполнение трех циклов промывки.

Протокол анализа

1. Подготавливают пробы в соответствии с разделом 8 (Подготовка проб) и реагенты в соответствии с разделом 9 (Подготовка реагентов).
2. Вносят 100 мкл нулевого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки H1, H2 = бланк)

Вносят 50 мкл нулевого градуировочного раствора (макс. опт. плотность) в двух повторностях (лунки A1, A2).

Вносят 50 мкл каждого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки от B1,2 до G1,2, т.е. 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 и 2.0 нг/мл).

3. Вносят по 50 мкл каждой пробы в двух повторностях (40 проб/ 80 лунок)
4. Вносят по 50 мкл конъюгата во все лунки за исключением H1 и H2.
5. Планшет запечатывают и перемешивают в течение нескольких секунд его содержимое (на шейкере для микротитровальных планшетов либо аккуратными круговыми движениями).
6. Планшет инкубируют в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре (20-25ºC).
7. Удаляют раствор из микротитровального планшета и промывают 3 раза буфером для промывания.
8. Вносят по 100 мкл раствора субстрата во все лунки.
9. Тщательно перемешивают и инкубируют планшет в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре (20˚C - 25˚C).
10. Вносят по 100 мкл стоп-реагента во все лунки.
11. Сразу же измеряют оптическую плотность при 450 нм.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычтите среднее значение оптической плотности (ОП) для лунок H1 и H2 (бланк) из отдельных значений ОП для лунок, содержащих градуировочные растворы и пробы.

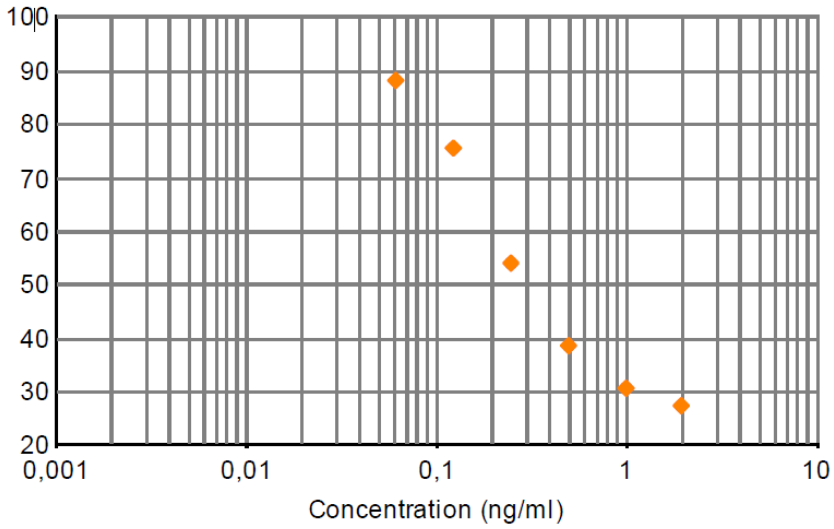
Значения ОП для шести градуировочных растворов и проб (среднее значение двух повторностей) делят на среднее значение ОП нулевого градуировочного раствора (лунки A1 и A2) и

умножают на 100. Таким образом, нулевой градуировочный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения ОП приводятся в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП стандарта 0 нг/мл}} \times 100\% = \%\ \text{от максимальной оптической плотности}$$

Градуировочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для градуировочных растворов, наносятся на график (по оси Y) напротив эквивалентной концентрации нитрофурана AHD (мкг/мл) по логарифмической оси X.



Пример градуировочной кривой

Альтернативный способ построения градуировочной кривой:

Значения оптических плотностей, вычисленные для градуировочных растворов в logit формате, наносятся на график (по оси Y) напротив эквивалентной концентрации нитрофурана AHD (нг/мл) по логарифмической оси X.

Количество нитрофурана AHD в пробе выражается как эквивалент нитрофурана AHD. Эквивалент нитрофурана AHD в пробе (нг/мл), соответствующий % от максимальной оптической плотности каждого экстракта, может быть получен по градуировочной кривой.

У всех матриц одинаковый фактор разведения. Для получения концентрации нитрофурана AHD в пробах значение концентрации нитрофурана AHD, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на 2

12. ЛИТЕРАТУРА

1. Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), Monographs and Evaluations Web site, http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v31je07.htm, 31 October 2006

2. Van Koten-Vermeulen, J.E.M., Wouters, M.F.A., Van Leeuwen, F.X.R. Report of the 40th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organisation, Geneva 1993, 85-123.

3. European Union Commission Regulation 1442/95, Off. J. Eur. Commun. 1995, L143, 26-30

4. European Union Commission Regulation 2901/93, Off. J. Eur. Commun. 1993, L264, 1-4

5. Nouws, J.F.M. , Laurensen, J. Vet. Q. 1990, 12, 56-59

6. McCracken, R.J., Blanchflower, W.J., Rowan, C., McCoy, M.A., Kennedy, D.G. Analyst 1995, 120, 2347-2351

7. Hoogenboom, L.A.P., Tomassini, O., Oorsprong, M.B.M., Kuiper, H.A. Chem. Toxicol. 1991, 29, 185-191

8. McCracken, R.J., Kennedy, D.G. Chromatogr. A 1997, 771, 349-354

9. Gottschall, D.W., Wang, R. J. Agric. Food Chem. 1995, 43, 2520-2525

13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для размещения заказа на тест-набор на нитрофуран AHD используйте код набора 5091AHD.