

DIMETRIDAZOLE ELISA

(5091DIME[9]04.20)

**Тест-система для скрининга и количественного определения
диметридазола методом конкурентного иммуноферментного
анализа**

DIMETRIDAZOLE ELISA



Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в Беларуси
ОДО "КомПродСервис"
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50
www.komprod.com, info@komprod.com



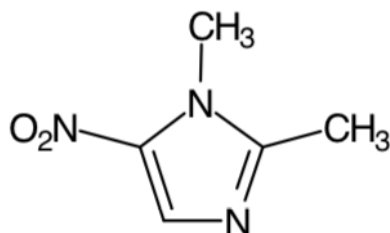
Официальный дистрибьютор
R-Biopharm в России
ООО "Неотест"
+7 (499) 649-02-01
info@neo-test.ru, www.neo-test.ru

Краткая информация

DIMETRIDAZOLE ELISA представляет собой тест-систему для определения диметридазола методом конкурентного иммуноферментного анализа. С помощью тест-системы можно выполнить 96 определений. При выполнении анализов стандартных и исследуемых растворов в двух повторностях, в помощью одной тест-системы можно проанализировать 40 проб.

Тест-система содержит все реагенты, необходимые для постановки ИФА. Реагенты, необходимые для пробоподготовки, не входят в состав тест-системы.

1. Введение



Химическая структура диметридазола

Диметридазол (ДМЗ) относится к ветеринарным препаратам группы 5-нитроимидазолов, широко применяющимся для профилактики и лечения гистомоноза индеек, трихомоноза голубей, генитального трихомоноза КРС, а также геморрагических энтеритов у свиней. Согласно Приложению IV Европейского регламента 2377/90/ЕС использование диметридазола при выращивании сельскохозяйственных животных запрещено [1]. Отравление диметридазолом вызывает бесплодие, повреждения печени и почечную недостаточность.

2. Принцип метода.

Микротитровальный планшет, входящий в комплектацию тест-системы состоит из 12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами. В лунки дозируют растворы стандартов или проб и конъюгат ДМЗ с пероксидазой. Свободный ДМЗ стандартных и исследуемых растворов и ДМЗ ферментного конъюгата конкурируют за места связывания антител (конкурентный иммуноферментный анализ). После инкубации в течение одного часа, несвязанные компоненты удаляются в процессе промывки. Количество связавшегося конъюгата визуализируется на следующей стадии, при добавлении смеси субстрата с хромогеном (H_2O_2 и ТМБ). Конъюгат на поверхности планшета преобразуют бесцветный хромоген в раствор синего цвета. Добавление серной кислоты ведёт к изменению окраски от синей на жёлтую. Измерение интенсивности окраски выполняют фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность раствора обратно пропорциональна концентрации диметридазола в пробе.

3. Специфичность и чувствительность

В тест-системе используются кроличьи антитела к белковому конъюгату диметридазола, обладающие следующей специфичностью:

Диметридазол.....	100 %
Метронидазол.....	7,4 %
Гидроксидиметридазол	5,3 %
Ронидазол	8,5 %
Ипронидазол	7,4 %
Никарбазин	0,1 %
Галофугинон	< 0,02 %
Диклазурил	< 0,02 %
Робенидин	< 0,02 %
Гидроксиметронидазол	0,1 %
Гидроксиипронидазол	0,5 %

LOD (предел обнаружения) рассчитан как: $X_n + 3SD$ и был определен при оптимальных условиях.

Матрица	Раздел методики	LOD, мкг/кг (л)
Креветки	8.1	0,8
Ткани	8.2	0,3
Молоко	8.3	0,3
Яйцо	8.2	0,3
Сыворотка крови	8.4	0,3

4. Обращение с тест-системой и её хранение

- Храните тест-систему при 2°C – 8 °C в темном месте. Храните компоненты тест-системы с целью их последующего использования в условиях, определённых в разделе 9.
 - После истечения срока годности набора (см. этикетку), гарантия не сохраняется.
 - Перед вскрытием упаковки доведите закрытый микротитровальный планшет до комнатной температуры во избежание конденсации влаги в лунках планшета.
 - Разбавляйте компоненты тест-системы непосредственно перед использованием, но после того, как они будут доведены до комнатной температуры.
 - Раствор субстрата/хромогена следует хранить в холодильнике (2 – 8°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке.
 - Следует избегать попадания прямого света на раствор хромогена.
- Признаки непригодности реагентов:
- Синяя окраска раствора субстрата, перед постановкой анализа.

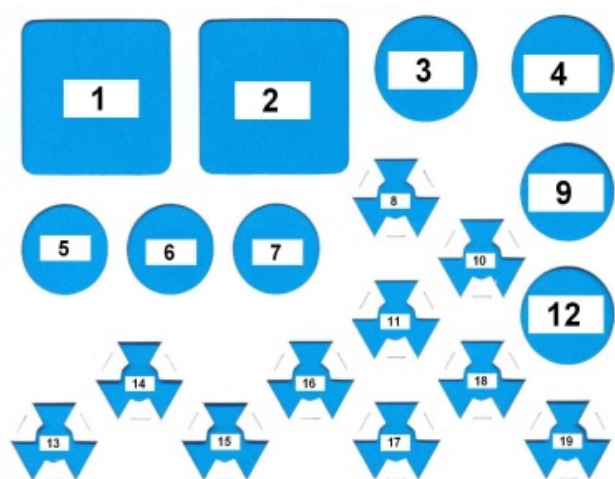
- Слабая или отсутствующая цветовая реакция нулевого стандарта (E450nm < 0,8).

5. Содержание набора

Руководство

Микротитровальный планшет, покрытый антителами (96 лунок) (12 стрипов, 8 лунок каждый). Планшет готов к использованию.

Положение реагентов в наборе. Для подготовки реагентов см. главу 9.



1. Буфер для разбавления (20 мл, 10x концентрат)
2. Моющий буфер (30 мл, 20x концентрат)
3. Раствор субстрата (12 мл, готов к использованию)
4. Стоп-раствор (15 мл, готов к использованию)
5. Не используется
6. Не используется
7. Не используется
8. Конъюгат (100x концентрат)
9. Не используется
10. Не используется
11. Не используется
12. Не используется
13. Нулевой стандарт (2 мл, готов к использованию)
14. Стандартный раствор 1 (1 мл, готов к использованию) 0,313 нг/мл
15. Стандартный раствор 2 (1 мл, готов к использованию) 0,625 нг/мл
16. Стандартный раствор 3 (1 мл, готов к использованию) 1,25 нг/мл
17. Стандартный раствор 4 (1 мл, готов к использованию) 2,5 нг/мл
18. Стандартный раствор 5 (1 мл, готов к использованию) 5 нг/мл
19. Стандартный раствор 6 (1 мл, готов к использованию) 10 нг/мл

6. Оборудование и материалы необходимые дополнительно

- Весы и емкости для взвешивания
- Перчатки
- Гомогенизатор (вортекс, миксер)
- Центрифуга (2000 x g)
- Автоматизированная мойка планшетов или 8-канальная пипетка на 100 – 300 мкл
- Шейкер для микротитровальных планшетов
- Микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм
- Автоматические пипетки на 100 – 1000 мкл
- Степпер с наконечниками на 2,5 мл
- Метанол 100%
- Ацетонитрил
- Н-гексан
- Стеклянные виалы на 4 мл
- Полипропиленовые пробирки с завинчивающейся крышкой, 15 мл

7. Меры предосторожности

- Диметридазол токсичен. Избегайте попадания в рот и на кожу. Будьте внимательны, чтобы не вдохнуть аэрозоль.
- Стоп-раствор содержит 0,5 М серную кислоту. Избегайте контакта с кожей.
- Избегать контакта всех биологических материалов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не пипетируйте ртом.
- В пределах рабочей зоны не ешьте, не пейте, не курите, не храните и не готовьте продукты, а также не используйте косметические средства.
- ТМБ токсичен при вдыхании, при контакте с кожей и проглатывании; соблюдайте осторожность при обращении с субстратом.
- Не используйте компоненты по истечении срока годности и не используйте реагенты из разных тест систем с разными номерами лотов.
- Каждая лунка используется в качестве оптической кюветы. Поэтому не прикасайтесь к дну лунки, не допускайте повреждений и загрязнений.
- Все компоненты тест-системы должны быть полностью растворены перед использованием. Особое внимание обратите на субстрат, который кристаллизуется при температуре +4°C.

Оптимальные результаты будут получены путем строго соблюдения этой инструкции. Тщательное пипетирование и отмывка в течение анализа необходимы для поддержания хорошей точности и сходимости результатов.

8. Пробоподготовка

8.1. Креветки

- поместите навеску 2 г гомогенизированной пробы в пробирку на 15 мл
- прибавьте 8 мл ацетонитрила и перемешайте с помощью вортекса

- поместите пробирку в ультразвуковую баню на 5 мин
- центрифугируйте в течение 10 мин при 2000 g
- перенесите 4 мл супернатанта в чистую пробирку
- испарите досуха в слабом токе азота при 50°C
- растворите сухой остаток в 100 мкл метанола, перемешайте с помощью вортекса, добавьте 0,9 мл буфера для разбавления, перемешайте
- внесите для анализа 50 мкл на лунку

8.2. Куриное мясо и яйцо

- поместите навеску 2 г гомогенизированной пробы яйца или куриного фарша в пробирку на 50 мл
- прибавьте 8 мл ацетонитрила, перемешивайте с помощью вортекса в течение 1 минуты
- поместите пробирку в ультразвуковую баню на 5 мин
- центрифугируйте в течение 10 мин при 2000 g при комнатной температуре
- перенесите супернатант в чистую пробирку на 10 мл и испарите досуха в слабом токе азота при 50°C
- внесите в пробирку 1 мл н-гексана и тщательно перемешайте. Внесите в пробирку 1 мл раствора метанола в воде (3:1) и перемешайте с помощью вортекса в течение 10 сек
- поместите пробирку в водяную баню на 5 минут при 40°C, центрифугируйте в течение 5 мин при 2000 g при комнатной температуре.
- осторожно удалите слой гексана и межфазную эмульсию. После удаления гексана в пробирке должно остаться примерно 1 мл раствора
- испарите досуха
- растворите сухой остаток в 100 мкл 100% метанола, перемешайте с помощью вортекса, затем добавьте 1,9 мл буфера для разбавления. Тщательно перемешайте. Перед внесением на планшет выдержите раствор при температуре 2°C до 8°C минимум 1 час
- внесите для анализа 50 мкл на лунку

8.3. Молоко

Примечание:

pH проб существенно влияет на результаты, если необходимо доведите pH образца до $7 \pm 0,5$

- разбавьте пробу в 2 раза буфером для разбавления (например, 100 мкл молока + 100 мкл буфера)
- перемешайте разбавленное молоко на вортексе
- используйте для анализа 50 мкл на лунку.

8.4. Сыворотка

- если сыворотка мутная, отцентрифугируйте в течение 15 минут при 2000 g
- разбавьте 1:4 с помощью буфера для разбавления (например, 100 мкл сыворотки + 300 мкл буфера для разбавления проб)
- перемешивайте разбавленную сыворотку на вортексе,
- внесите для анализа 50 мкл на лунку

9. Подготовка реагентов

Перед началом анализа, реагенты должны быть доведены до комнатной температуры. Любые неиспользуемые реагенты, следует немедленно вернуть на хранение при температуре 2°C до 8°C. Подготовьте реагенты перед использованием.

Микротитровальный планшет

Уберите неиспользуемые стрипы в пакет с осушителем, закройте застёжку пакета и храните при температуре +2°C до +8°C для использования в последующих анализах. Сохраните также держатель стрипов.

Моющий буфер

Моющий буфер поставляется в виде 20-тикратного концентрата. Готовьте раствор непосредственно перед использованием. На один стрип используется 40 мл разбавленного моющего буфера (2 мл концентрата + 38 мл дистиллированной воды).

Раствор субстрата/хромогена

Раствор субстрата/хромогена (готов к использованию) может кристаллизоваться при температуре +4°C. Доведите температуру виалы до комнатной (20 – 25°C, хранить в темноте) и тщательно перемешайте перед дозированием в лунки.

Буфер для разбавления (10x концентрат)

Буфер для разбавления представляет собой 10-кратный концентрат. Разбавьте буфер дистиллированной водой (например 10 мл буфера + 90 мл воды) перед использованием. Концентрированный буфер перед разбавлением следует довести до комнатной температуры и тщательно перемешать до полного растворения осадка, который мог образоваться при хранении. Разбавленный буфер следует хранить при температуре 2°C- 8°C до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Конъюгат (100x концентрат)

Отцентрифугируйте пробирку с конъюгатом в течение короткого периода времени (1 мин/ 1000 g). Для восстановления разбавьте концентрат 1:100 (1+99) буфером для разбавления (например, 10 мкл концентрата конъюгата + 990 мкл буфера для разбавления). На 2 стрипа по 8 лунок достаточно 800 мкл разбавленного конъюгата.

Храните неиспользованный концентрированный конъюгат при температуре 2°C - 8°C.

10. Процедура анализа

Протокол отмывки:

Несвязанные компоненты должны эффективно удаляться между каждым этапом инкубации при ИФА. Это достигается надлежащей отмывкой планшета. Каждая процедура отмывки должна выполняться тщательно, чтобы гарантировать хорошую внутри- и межпланшетную воспроизводимость.

Ручную отмывку или отмывку с помощью автоматического устройства можно выполнить следующим образом:

Ручная отмывка:

1. Вылейте жидкость из лунок, переверните микротитровальный планшет вверх дном и удалите оставшуюся жидкость, путем постукивания по бумажному полотенцу.

2. Заполните все лунки моющим буфером по кромку (300 мкл).

3. Цикл отмывки (1 и 2) должен повторяться 3 раза.

4. Переверните планшет вверх дном и опустошите лунки, резко его встряхнув.

5. Поместите перевернутый планшет на впитывающие бумажные полотенца и хорошо постучите им по полотенцам, чтобы удалить остатки моющего буфера из лунок.

6. Не допускайте высыхания лунок до добавления следующего реагента.

Отмывка автоматическим оборудованием для отмывки микротитровальных планшетов:

При использовании автоматического моющего оборудования, проверьте, что из всех лунок отбирается жидкость и лунки полностью заполняются моющим буфером во время каждого цикла отмывки. Моющее оборудование должно быть запрограммировано на три цикла отмывки.

Протокол анализа

1. Подготовьте пробы, следуя главе 8 (пробоподготовка), и реагенты, следуя главе 9 (подготовка реагентов).
2. Добавьте по 100 мкл нулевого стандарта в двух параллелях (лунки Н1, Н2;бланк)
Добавьте по 50 мкл нулевого стандарта в двух параллелях (лунки А1, А2; максимальная ОП)
Добавьте по 50 мкл каждого стандарта в двух параллелях (лунки от В1,2 до G1,2, напр., 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5 и 10 нг/мл)
Внесите по 50 мкл каждого исследуемого раствора в двух параллелях в оставшиеся лунки на планшете (40 проб, 80 лунок).
3. Внесите по 50 мкл конъюгата во все лунки, кроме Н1 и Н2.
4. Закройте микротитровальный планшет и перемешайте содержимое лунок в течение нескольких секунд.
5. Инкубируйте 1 час в темноте при 4°C (2°C - 8°C).

6. Вылейте раствор из лунок микротитровального планшета и промойте 3 раза моющим буфером.
7. Добавьте 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Инкубируйте 30 минут в темноте при комнатной температуре (от 20°C до 25 °C).
8. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
9. Немедленно измерьте оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

11. Интерпретация результатов

Вычитите значение оптической плотности (O.D.) лунок H1 и H2 (бланк) из оптической плотности лунок, содержащих стандарты и пробы.

Значения оптических плотностей для шести стандартов и проб (их средние значения для двух параллелей) делят на среднее значение величины оптической плотности для нулевого стандарта/ V_{max} (лунки A1 и A2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой стандарт (V_{max}) приравнивается к 100% (максимальному поглощению), а другие значения оптических плотностей выражают в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{Оптическая плотность стандарта (или пробы)}}{\text{Оптическая плотность } V_{max}} \times 100\% = \% \text{ max оптической плотности}$$

Калибровочная кривая:

Полученные величины (% максимальной оптической плотности), рассчитанные для стандартных растворов, откладываются по ординате, соответствующие логарифмы концентрации (нг/мл) - по абсциссе.

Альтернативная калибровочная кривая:

Оптические плотности для стандартных растворов наносятся на шкалу Y против концентрации по оси X. Шкала Y – логит, шкала по оси X – логарифмическая.

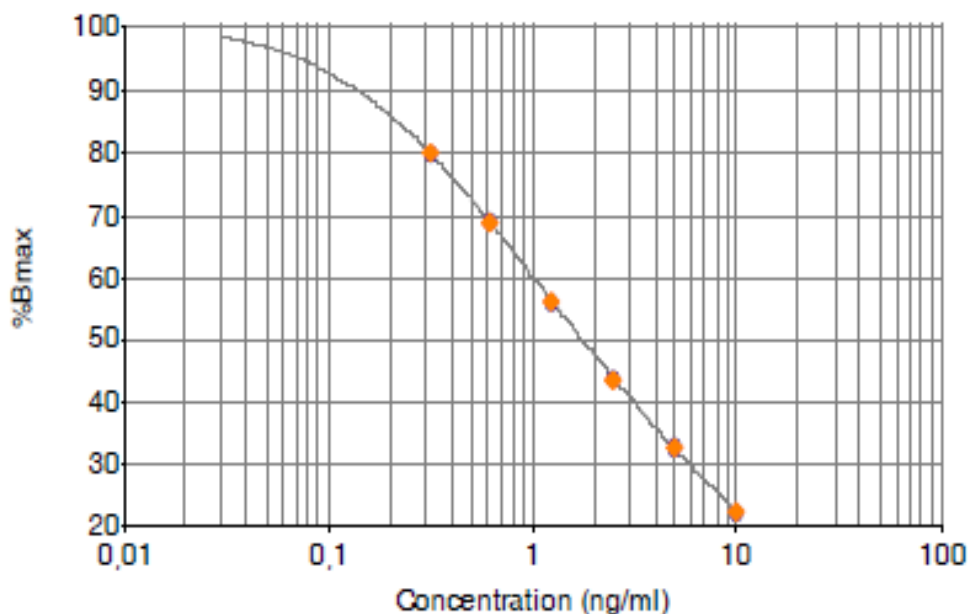


Рис. 1: Пример калибровочной кривой

8.1. Креветки

Для того, чтобы получить концентрацию эквивалентов диметридазола в исследуемых пробах креветок, результат, полученный по калибровочной кривой, нужно умножить на фактор разбавления – 1,25.

8.2. Куриное мясо и яйцо

Концентрация эквивалентов диметридазола в исследуемых пробах считается непосредственно по калибровочной кривой.

8.3. Молоко

Для того, чтобы получить концентрацию эквивалентов диметридазола в исследуемых пробах молока, результат, полученный по калибровочной кривой, нужно умножить на фактор разбавления – 2.

8.4. Сыворотка

Для того, чтобы получить концентрацию эквивалентов диметридазола в исследуемых пробах сыворотки крови, результат, полученный по калибровочной кривой, нужно умножить на фактор разбавления – 4.

12. Литература

Регламент Европейского совета 2377/90 от 26 июня 1990 г, устанавливающий процедуру обоснования максимально допустимых уровней ветеринарных препаратов в пищевых продуктах животного происхождения. Official J. European Union, L224, 1-8.

13. Информация для заказа

Для заказа тест-системы диметридазол ELISA, используйте артикул 5091DIME.



Техническая поддержка и прием заявок:
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50, +7 (499) 649-02-01
info@komprod.com, support@komprod.com, info@neo-test.ru