

Вирджиниамицин ИФА
5151 VIG [8]04.20
Иммуноферментный метод
для скрининга и количественного
определения вирджиниамицина в различных матрицах



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

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Тест-набор для ИФА вирджиниамицина это конкурентный иммуноферментный анализ для количественного анализа вирджиниамицина в различных матрицах (моче, молоке, кормах). Основой тест-набора являются антитела к вирджиниамицину. ИФА-набор содержит микротитровальный планшет на 96 лунок и все реагенты, необходимые для проведения анализа, в т.ч. градуировочные растворы. В инструкции описаны способы быстрой и качественной экстракции вирджиниамицинов из различных матриц.

1. ВВЕДЕНИЕ

Антибактериальные препараты, предназначенные для использования в качестве стимуляторов роста, добавляются к корму всего стада на субтерапевтических уровнях в течение длительного периода времени. Антибактериальные стимуляторы роста регулируются Директивой Совета 70/524 / ЕЕС как зоотехнические кормовые добавки. Всякий раз, когда лекарственные препараты вводятся животным-производителям пищевых продуктов, вероятны их остатки в тканях, молоке или яйцах. Остатки антибактериальных препаратов в пище могут привести к аллергическим реакциям, но наибольшую угрозу представляет развитие устойчивых штаммов бактерий, которые могут привести к неправильному ответу на обычное лекарственное лечение у людей. По этим причинам Европейская комиссия решила запретить некоторые из стимуляторов роста. Постановлением Совета 2821/98 цинк бацитрацин, спирамицин, тилозин и вирджиниамицин были запрещены в кормах для животных.

2. ПРИНЦИПЫ ИФА ВИРДЖИНИАМИЦИНА

Тест-набор для проведения ИФА включает 12 стрипов по 8 лунок, сенсibilизированных кроличьими антителами к вирджиниамицину. Вирджиниамицин, маркированный пероксидазой хрена, градуировочные растворы либо растворы проб вносятся в лунки планшета. Свободный вирджиниамицин, присутствующий в пробе либо градуировочном растворе, и ферментно маркированный вирджиниамицин конкурируют за центры связывания антител (конкурентный ИФА).

После инкубации в течение 1 часа несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки. Количество связанного ферментно маркированного вирджиниамицина визуализируется внесением смеси субстрат/хромоген (H_2O_2 / 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 вирджиниамицина в пробе.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного тест-набора ИФА используются специфические антитела, полученные с помощью вирджиниамицина, конъюгированного белком. Специфичность к вирджиниамицину – 100%.

Предел обнаружения (LOD) рассчитывается по формуле: $X_p + 3SD$ и определяется при оптимальных условиях.

Матрица	Вариант пробоподготовки	Предел обнаружения мкг/кг (ppb)
Молоко	8.1	8
Корма	8.2	40
Моча	8.3	14

4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

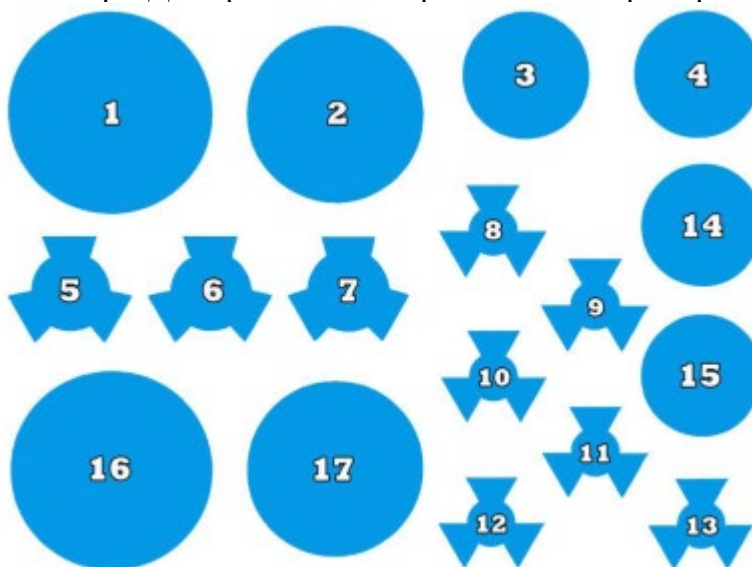
- Набор реагентов должен храниться при температуре от +2°C до +8°C в темном месте. Не замораживать.
- После истечения срока годности невозможно гарантировать приемлемое качество.
- Перед проведением анализа все компоненты тест-набора, включая микротитровальный планшет, должны быть доведены до комнатной температуры.
- Следует избегать появления конденсата в лунках планшета. Планшет должен быть согрет до температуры окружающей среды перед вскрытием упаковки.
- 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 ($E_{450\text{nm}} < 0,8$)

5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Инструкция

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

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



1. **Буфер для разведения образцов** (40 мл, готов к использованию)
2. **Буфер для промывки планшета** (30 мл, концентрат 20x)
3. **Раствор субстрата** (12 мл, готов к использованию)
4. **Стоп-реагент** (15 мл, готов к использованию)
5. **Стандарт** (12,5 нг/мл, лиофилизированный)
6. **Стандарт** (12,5 нг/мл, лиофилизированный)
7. **Стандарт** (12,5 нг/мл, лиофилизированный)
8. **Конъюгат** (150 мкл, концентрации 100x)
9. не используется
10. не используется
11. не используется

12. не используется
13. не используется
14. **Разбавитель для конъюгата** (10 мл, готов к использованию)
15. не используется
16. не используется
17. не используется
18. не используется
19. не используется

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

- весы
- перчатки
- стеклянные пробирки 10-15 мл
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100-300 мкл
- шейкер для микротитровальных планшетов
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм
- пипет-дозаторы 20-200 мкл, 100-1000 мкл
- 8-канальная микропипетка 100-300 мкл
- фольга или парафильм

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Избегать контакта проб с кожей и слизистыми.
- Не пипетировать ртом.
- Не допускается есть, пить, курить, хранить или готовить пищу или применять косметику в пределах обозначенной рабочей области.
- 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

Тест-набор может быть использован для определения вирджиниамицина в различных матрицах. Мы представили Вам информацию о различных вариантах пробоподготовки, но возможно также использование альтернативных методов.

8.1 Молоко

- Отрегулируйте pH молока до 7 (+/- 0,5) с помощью 0,1 М NaOH.

- Центрифугируйте образцы холодного молока в течение 15 минут при 2000 x g при 4 °С.
- Снимите верхний жировой слой с помощью шпателя.
- Разведите образец обезжиренного молока в 20 раз в буфере для разведения образцов (10 мкл обезжиренного молока + 190 мкл буфера для разведения образцов).
- Смешайте разбавленное молоко (вортекс).
- В тесте используйте аликвоту 50 мкл.

8.2 Корма

- Измельчите от 10 до 100 граммов пробы корма.
- Гомогенизируйте 0,5 грамм измельченного корма с 4,5 мл дистиллированной воды.
- Перемешайте на вортексе, а затем примешивайте переворачиванием в течение 15 минут.
- Центрифугируйте в течение 10 минут при 2000 x g.
- Разбавьте супернатант 1:10, 50 мкл супернатанта + 450 мкл буфера для разведения образцов.
 - В тесте используйте аликвоту 50 мкл.

8.3 Моча

- Образцы мочи могут быть проанализированы после 100-кратного разбавления в буфере для разведения образцов.
- Разведение: добавить к 10 мкл мочи 90 мкл буфера для разведения образцов (1:10).
- Перемешайте на вортексе.
- Возьмите 50 мкл мочи, разведенной 1:10 и добавьте 450 мкл буфера для разведения образцов. (Общее разведение 1: 100).
- Перемешайте на вортексе.
- В тесте используйте аликвоту 50 мкл.

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

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

Микротитровальный планшет

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

Конъюгат

Конъюгат поставляется в концентрированном виде (x100). Центрифугируйте конъюгат во флаконе (1 минута, 1000 x g). Добавьте к 10 мкл концентрированного раствора конъюгата 990 мкл разбавителя для конъюгата. На 2 x 8 лунок требуется 800 мкл рабочего раствора конъюгата. Хранить неиспользованный концентрированный конъюгат при -20 °С.

Стандарт (3x12,5 нг/мл)

Подготовьте ряд градуировочных растворов вирджицинамина. Для этого добавьте 2 мл буфера для разведения образцов в виалу с концентратом стандарта и перемешайте. Концентрация полученного раствора составляет 12,5 нг/мл. Выполните ряд последовательных разведений (1:1) для получения градуировочных растворов концентрации 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 и 0,39 нг/мл. Стандарты надо готовить непосредственно перед выполнением теста.

Буфер для промывки

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

Раствор субстрата/хромогена

Раствор субстрата/хромогена (готовый к применению) осаждается при температуре +4°C. 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. Подготовьте пробы в соответствии с разделом 8 (Подготовка проб) и подготовьте реагенты в соответствии с разделом 9 (Подготовка реагентов).
2. Вносят 100 мкл буфера для разведения образцов в двух повторностях (лунки Н1, Н2, бланк).
Вносят 50 мкл буфера для разведения образцов (нулевой градуировочный раствор, макс. опт. плотность) в двух повторностях (лунки А1, А2).
Вносят 50 мкл каждого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки от В1,2 до G1,2, т.е. 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 и 0.39 нг/мл). В оставшиеся лунки вносят по 50 мкл каждой пробы в двух повторностях
3. Вносят по 50 мкл конъюгата во все лунки за исключением Н1 и Н2.

4. Планшет запечатывают и перемешивают в течение нескольких секунд его содержимое (на шейкере для микротитровальных планшетов либо аккуратными круговыми движениями). Планшет инкубируют в течение 1 часа в темноте при температуре 20-25°C.
5. Удаляют раствор из микротитровального планшета и промывают 3 раза буфером для промывания.
6. Вносят по 100 мкл раствора субстрата во все лунки.
7. Тщательно перемешивают и инкубируют планшет в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре (20°C - 25°C).
8. Вносят по 100 мкл стоп-реагента во все лунки.
9. Сразу же измеряют оптическую плотность при 450 нм.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

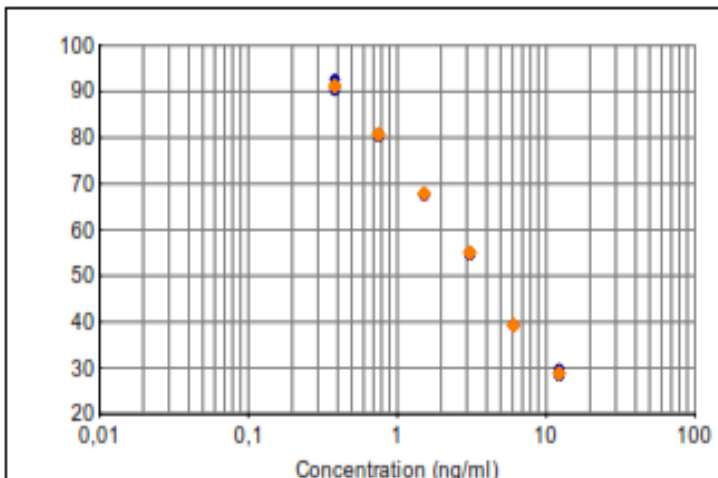
Вычитите среднее значение оптической плотности (ОП) для лунок Н1 и Н2 (бланк) из отдельных значений ОП для лунок, содержащих градуировочные растворы и пробы.

Значения ОП для шести градуировочных растворов и проб (среднее значение двух повторностей) делят на среднее значение ОП нулевого градуировочного раствора (лунки А1 и А2) 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.

$$\frac{\text{ОП градуировочного раствора (или пробы)}}{\text{ОП нулевого градуировочного раствора}} \times 100 = \% \text{ связывани}$$

Градуировочная кривая:

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



Пример градуировочной кривой

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

Для получения концентрации вирджиниамицина в пробах значение концентрации вирджиниамицина, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на

соответствующий коэффициент (см. таблицу) для получения значения концентрации вирджиниамицина в пробе.

Пункт	Продукт	Коэффициент
8.1	Молоко	20
8.2	Корм	100
8.3	Моча	100



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