ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ ТЕТРАЦИКЛИНОВ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА «ПРОДОСКРИН®Тетрациклин»

РАЗРАБОТАНО
Институт биоорганической химии НАН Беларуси
ТУ BY 100185129.149-2015

Официальный дистрибьютор
ОДО "КомПродСервис"
ул. Филимонова, 25 «Г»
220114, Минск
+375 (17) 336-50-54
+7 (499) 704-05-50
www.komprod.com
info@komprod.com

КомПродСервис

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система «ПРОДОСКРИН® Тетрациклин» предназначена для скрининговых исследований содержания остаточных количеств антибиотиков группы тетрациклинов (тетрациклина, хлортетрациклина, ролитетрациклина, демеклоциклина, окситетрациклина) в пищевых продуктах и продовольственном сырье животного происхождения, включающих мясо и готовые мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, жиры животные, шпик, субпродукты, рыбу и продукты из рыбы, молоко (сырое, пастеризованное и стерилизованное), молоко сухое восстановленное и сгущенное, коктейли молочные, мороженое на молочной основе, молочные смеси для детского питания, молочную сыворотку и восстановленную молочную сыворотку, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта, тан, айран, простокваша т.п.), творог и творожные продукты, масло сливочное, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), яйцо и яичный порошок, мед методом иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2 Антибиотики тетрациклинового ряда как эффективные бактериостатики широко используются в ветеринарной практике. Они удобны для терапии, недороги, малотоксичны, имеют широкий спектр активности в отношении как грам-положительных, так и грам-отрицательных бактерий и применяются для профилактики и лечения заболеваний животных, а также как стимулирующие рост кормовые добавки. В странах ЕС тетрациклины составляют 65 % всех антибиотиков, применяемых в терапевтических и профилактических целях в ветеринарной медицине. Однако интенсивное использование тетрациклинов в животноводстве приводит к накоплению остатков этих лекарств в животноводческой продукции и развитию устойчивых штаммов патогенных бактерий потенциально опасных для здоровья человека. Поэтому во многих странах мира, в том числе и в Республике Беларусь, установлены предельно допустимые концентрации остаточных количеств тетрациклинов в пищевой продукции животного происхождения и введена система обязательного контроля содержания антибиотиков данной группы в различных видах продукции.

1.3 Тест-система рассчитана на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых (неизвестных) проб и 6 градуировочных растворов, всего 96 определений в диапазоне концентраций 0,05-1,8 мкг/л или мкг/кг. Конструкция тест-системы позволяет осуществить несколько постановок ИФА: например, одна постановка – 4 стрипа (32 лунки). Продолжительность анализа составляет около 1,5 ч без учета пробоподготовки.

2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2.1 В состав тест-системы входят следующие компоненты, представленные в таблице1.

Таблица 1– Состав тест-системы

Компонент тест-системы	Количество в комплекте
1	2
Микропланшет-иммуносорбент, планшет с иммобилизованным коньюгатом тетрациклина с белком	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок

Продолжение таблицы 1

1	2
Градуировочные растворы (C_1–C_6) с концентрациями тетрациклина в диапазоне (0–18,0) мкг/л, концентраты, (точные значения концентраций указываются в паспорте к тест-системе)	6 микропробирок или флаконов по 1,3 мл
Конъюгат антивидовых антител и пероксидазы из корней хрена	1 флакон, 10 мл
Антитела к тетрациклину	1 флакон, 6 мл
Буфер 1 для приготовления градуировочных растворов и разведения исследуемых проб	1 флакон, 60мл
Буфер 2 для приготовления градуировочных растворов и разведения исследуемых проб молока и молочных продуктов	1 флакон, 60мл
Моющий буфер, 10-кратный концентрат	1 флакон, 100 мл
Субстрат	1 флакон, 14 мл
Хромоген (раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, ТМБ)	1 флакон, 0,7 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл

Примечание – По усмотрению изготовителя и по заказу потребителя в состав тест-системы может быть включен хромоген-субстратный раствор в виде готового к использованию компонента вместо растворов хромогена и субстрата, 1 флакон, 12 мл.

2.2 Принцип работы тест-системы основан на непрямом конкурентном иммуноферментном анализе. В лунках планшетного иммуносорбента во время инкубации на первой стадии происходит конкурентное связывание поликлональных антител с иммобилизованным белковым коньюгатом тетрациклина и тетрациклином, а также антибиотиками группы тетрациклинов в составе градуировочных растворов и анализируемых проб. Количество адсорбированных на твердой фазе специфических антител выявляют с помощью коньюгата антивидовых иммуноглобулинов с пероксидазой из корней хрена на второй стадии анализа после промывки лунок. Чем больше антибиотиков группы тетрациклинов содержится в пробе, тем меньше антител связывается с иммобилизованным антигеном. Несвязанные антивидовые антитела удаляют моющим буфером и вносят в лунки раствор субстрата пероксидазы (пероксид водорода) и хромогена (ТМБ). Развивается цветная реакция, которую останавливают путем добавления стоп-реагента (1 М раствор серной кислоты). Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют в многоканальном планшетном спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП обратно пропорциональна концентрации тетрациклина в пробе. По градуировочной кривой рассчитывается концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

3.1 При работе с тест-системой следует надевать халат и одноразовые пластиковые или резиновые перчатки, т.к. данная тест-система содержит токсичный антибиотик тетрациклин и химические реагенты.

3.2 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией. При работе с метанолом и его растворами следует строго соблюдать требования

инструкции по технике безопасности при работе с метанолом, утвержденной в установленном порядке.

3.3 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть раствор кислоты большим количеством воды.

3.4 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с тест-системой, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

3.5 Запрещен прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с тест-системой.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

4.1 Для исключения некорректных результатов исследуемые образцы продуктов необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст.

Пробу каждого образца, а также реагенты тест-системы необходимо отбирать отдельным наконечником к пипетке.

4.2 Не допускается использование тест-системы после окончания срока годности, а также смешивание компонентов тест-систем разных серий.

4.3 Перед постановкой ИФА все компоненты тест-системы должны быть доведены до комнатной температуры.

4.4 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость.

4.5 Вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой. Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе специализированного моющего средства промывают водопроводной и ополаскивают дистиллированной водой, высушивают. Запрещается многократное использование одноразовой лабораторной посуды и применение бытовых моющих средств.

4.6 Необходимо обратить внимание на тщательное, но аккуратное перемешивание содержимого каждого компонента, а также реагентов в лунке. Во всех случаях следует избегать образования пены.

4.7 Если проведение ИФА начато, то все последовательные стадии следует заканчивать, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени. Необходимо исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

4.8 Необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %), а также аттестованный прибор для измерения оптической плотности (планшетный спектрофотометр).

4.9 Во время проведения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности. Не следует держать компоненты на ярком свету во время инкубации или при хранении.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 При работе с тест-системой следует использовать следующие средства измерений, оборудование и материалы:

- весы лабораторные общего назначения с точностью взвешивания 0,01 г;
- автоматический фотометр, позволяющий измерять ОП раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов, 8- или 12-канальное (не обязательно);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- пипетки 8-канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- гомогенизатор тканей лабораторный или блендер бытовой;
- лабораторный шейкер, обеспечивающий частоту вращения до 300 об/мин;
- вортекс лабораторный, обеспечивающий частоту вращения до 3000 об/мин;
- лабораторный ротатор, обеспечивающий частоту вращения до 60 об/мин;
- лабораторный миксер, обеспечивающий скорость в диапазоне от 200 об/мин до 2000 об/мин;
- центрифуга лабораторная с охлаждением до плюс 4 °С и скоростью вращения до 4000 g (пробирки вместимостью15 мл и 50 мл) и 20000 g (пробирки вместимостью 2 мл);
- холодильник бытовой с поддерживаемой температурой от плюс 2 °С до плюс 8 °С и морозильная камера с поддерживаемой температурой не выше минус 18 °С;
- pH-метр с диапазоном измерений от 0 pH до 14 pH и погрешностью ± 0,1 pH в комплекте с электродами;
- термостат лабораторный;
- баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры в пределах (40-55) °С;
- баня ультразвуковая с частотой ультразвука 35 кГц, емкостью не менее 1,8 л;
- цилиндры мерные вместимостью 25 мл, 50 мл, 250 мл;
- стаканы мерные вместимостью 150 мл и 500 мл;
- колбы мерные, вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- колбы конические вместимостью 100 мл, 250 мл и 500 мл;
- флакон из пластмассы черного цвета вместимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой;
- ванночки (кюветы) для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри для отбора жидкостей многоканальной пипеткой;
- изолирующая пленка для заклеивания планшетов;
- бумага фильтровальная;
- перчатки хирургические резиновые или пластиковые;
- пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающейся крышкой (типа Фалкон) вместимостью 50 и 15 мл:

- пробирки стеклянные вместимостью 5 или 10 мл;
- пробирки полипропиленовые центрифужные с крышкой (типа Эппендорф) вместимостью 2 мл;
- штативы для пробирок;
- шпатели пластиковые;
- пипетки Пастера;
- палочки стеклянные оплавленные.

5.2 При работе с тест-системой используются следующие реактивы:

- метанол ч.д.а по ГОСТ 6995;
- гексан ч. по ТУ 6-09-3375;
- вода дистиллированная и деионизованная;
- натрия фосфат двуосновной дигидрат ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ или натрий фосфорнокислый 2-замещенный, 12-водный ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ч.д.а. по ГОСТ 4172;
- натрия фосфат одноосновной моногидрат ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) или натрий фосфорнокислый 1-замещенный, 2-водный ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) ч.д.а. по ГОСТ 245;
- натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233;
- натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328;
- кислота янтарная ч.д.а. по ГСТ 6341

Допускается использовать другие средства измерений и вспомогательное оборудование по метрологическим и техническим характеристикам, а материалы и реактивы по качеству не уступающие указанным.

5.3 Приготовление растворов

5.3.1 Приготовление 20 мМ фосфатного буфера

Навески натрия фосфата одноосновного моногидрата 0,55 г (или натрия фосфорнокислого 1-замещенного, 2-водного 0,62 г), натрия фосфата двуосновного дигидрата 2,85 г (или натрия фосфорнокислого 2-замещенного, 12-водного 5,73 г), хлористого натрия 9,0 г помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и добавляют 500 мл дистиллированной воды. Перемешивают содержимое колбы до полного растворения соли, доводят до метки дистиллированной водой. Устанавливают pH раствора до 7,4 с помощью 30 %-ного раствора гидроокиси натрия.

5.3.2 Приготовление растворов метанола

Раствор метанола (1:9 по объему)

В емкость из темного стекла приливают отмеренные цилиндром 225 мл дистиллированной воды и 25 мл метанола и перемешивают.

Раствор метанола (2:8 по объему)

В емкость из темного стекла приливают отмеренные цилиндром 200 мл дистиллированной воды и 50 мл метанола и перемешивают.

Растворы метанола хранят при комнатной температуре в плотно закрытой пробками емкости не более 1 мес в соответствии с установленными правилами хранения метанола и его растворов.

5.3.3 Приготовление 50 мМ раствора янтарной кислоты

Навеску 5,9 г янтарной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и добавляют 500 мл дистиллированной воды. Перемешивают содержимое колбы до полного растворения соли, доводят до метки дистиллированной водой. Устанавливают

pH раствора до 4,0 с помощью 30 %-ого раствора гидроокиси натрия. Раствор хранят в холодильнике при (2-8) °С в течение 1 мес.

5.3.4 Приготовление 30 % раствора гидроокиси натрия

Навеску гидроокиси натрия массой 15,0 г помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, приливают отмеренные цилиндром 35 мл дистиллированной воды. После растворения гидроокиси натрия раствор охлаждают до комнатной температуры (20-25) °С. Приготовленный раствор переносят в полиэтиленовую или фторопластовую емкость и хранят при комнатной температуре (20 -25) °С не более трех месяцев.

6 ПОДГОТОВКА ПРОБ ПРОДУКТОВ

6.1 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы хранят в защищенном от света месте при температуре (2–8) °С не более 48 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не выше минус 20 °С) не более одного раза и хранение в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб, замороженные образцы должны быть разморожены при температуре (2–8) °С.

6.2 Подготовка проб мяса, рыбы, продуктов из рыбы и готовых мясных продуктов

6.2.1 Подготовка проб мяса, рыбы, продуктов из рыбы

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Исследуемые образцы мышечной ткани млекопитающих, рыбы или птицы в случае необходимости освобождают от жира и соединительной ткани. Образец гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Навеску образца массой 1,0 г помещают в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, добавляют в пробирку 9 мл 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного в соответствии с п. 5.3.1, перемешивают. После интенсивного десятиминутного встряхивания на шейкере (200-300) об/мин), пробу центрифугируют 10 минут при 4000 g и температуре 20-25 °С. При анализе проб с высоким содержанием жира проводят их обезжиривание гексаном. Для этого переносят 1 мл надосадочной жидкости в чистую центрифужную пробирку вместимостью 15 мл и добавляют 2 мл гексана, пробы перемешивают на вортексе в течение 10 с. Затем центрифугируют пробирки 10 минут при 4000 g и температуре 20-25 °С. Верхний слой (гексан) и слой жира между гексаном и водным раствором отбрасывают, а раствор используют для анализа. Фактор разведения 10.

6.2.2 Подготовка проб готовых мясных продуктов, жиров животных, шпика, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

С готовых к употреблению мясных продуктов удаляют оболочку и поверхностный слой. Образец гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Навеску образца массой 3,0 г помещают в стаканы вместимостью 150 мл или в контейнеры, входящие в комплект миксера. К навескам добавляют 30 мл 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного в соответствии с п. 5.3.1, и гомогенизируют с использованием лабораторного миксера, не допуская разбрызгивания смеси. Стаканы с пробами жиров животных, шпика нагревают до температуры (40 ± 5) °С при помешивании. Смесь гомогенизируют с помощью лабораторного

миксера/гомогенизатора, не допуская ее разбрызгивания. Переносят гомогенизированную смесь в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 мл и центрифугируют 10 минут при 4000 g и температуре 10 °С.

При анализе проб с высоким содержанием жира проводят их обезжиривание гексаном. Для этого переносят 1 мл над осадочной жидкости проб в новые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл. В пробирки добавляют отобранные дозатором 2 мл гексана и перемешивают их содержимое на вортексе в течение 10 с. Центрифугируют пробирки при температуре от 20-25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. Осторожно удаляют верхний гексановый слой с помощью пипетки Пастера или дозатором.

В отдельные пробирки вносят по 200 мкл буфера 1 для разбавления градуировочных растворов и прибавляют по 200 мкл надосадочной жидкости. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 20.

6.3 Подготовка проб молока и молочных продуктов

6.3.1 Молоко сырое, стерилизованное и пастеризованное, коктейли молочные, мороженое, молочные смеси для детского питания

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Для приготовления проб молока сырого, стерилизованного или пастеризованного, коктейлей молочных, мороженого отобранные образцы тщательно перемешивают, не допуская вспенивания. Отбирают 10 мл пробы в чистые центрифужные пробирки вместимостью 15 мл, центрифугируют 10 мин при 3000 g и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение (10-15) мин, охлаждая пробы до температуры (2-4) °С.

Шпателем удаляют верхний жировой слой. Отбирают 2 мл обезжиренной пробы чистым наконечником и переносят в чистую пробирку. Для обезжиренного молока процедуру по удалению жира не производят.

Доводят образцы до комнатной температуры. В отдельные пробирки вносят по 450 мкл буфера 2 для разбавления градуировочных растворов и прибавляют по 50 мкл проб. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 10.

6.3.2 Сухое молоко и молочная сыворотка

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Пробы сухих молочных продуктов (молока сухого цельного или обезжиренного, сыворотки молочной сухой) восстанавливают в соответствии с ГОСТ 29245.

Пробы сухих молочных продуктов массой 12,0 г, 12,5 г и 10,0 г (сухое молоко с содержанием жира 20 %, 25 % и иное, соответственно), 9,0 г (сухое обезжиренное молоко), 12,5 г сухой молочной сыворотки переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл и приливают небольшими порциями нагретую до температуры 40 °С дистиллированную воду при постоянном перемешивании. Доводят объем до метки дистиллированной водой и перемешивают на вортексе 10 мин. До начала анализа оставляют продукт в восстановленном виде минимум на 15 мин. Пробы молочных смесей для детского питания готовят в соответствии с инструкцией производителя.

Далее пробы восстановленного цельного молока подвергают процедуре

обезжиривания, согласно п.6.3.1, проводя центрифугирование в режиме: 10 мин при 3000 g и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая пробы молока до температуры 2-4 °С.

Шпателем удаляют верхний жировой слой. Отбирают 2 мл обезжиренного молока чистым наконечником и переносят в чистую пробирку. Для восстановленного сухого обезжиренного молока процедуру по удалению жира не производят.

В отдельные пробирки вносят по 450 мкл буфера 2 для разбавления градуировочных растворов и прибавляют по 50 мкл проб обезжиренного восстановленного молока. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 10.

Молочную сыворотку и растворенную сухую молочную сыворотку переносят в стакан и доводят pH раствора до 7,0, добавляя по каплям 30 %-ный раствор гидроокиси натрия. В отдельные пробирки вносят по 950 мкл буфера 2 для разбавления градуировочных растворов и прибавляют по 50 мкл проб молочной сыворотки и растворенной сухой сыворотки с доведенным значением pH. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 20.

6.4 Сыр

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают.

Навески сырной массы весом 15,0 г помещают в стаканы вместимостью 150 мл или в контейнеры, входящие в комплект миксера. К навескам добавляют 30 мл раствора метанола (1:9 по объему) и гомогенизируют с использованием лабораторного миксера, не допуская разбрызгивания смеси. Переносят гомогенизированную смесь в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 мл и выдерживают емкости на водяной бане при температуре 40-45 °С в течение 10 мин, периодически интенсивно встряхивая содержимое.

Проводят центрифугирование проб в течение 15 мин при 3000 g и 4 °С. Переносят 1 мл среднего водного слоя в пробирку для центрифугирования вместимостью 2 мл и центрифугируют при 20000 g и температуре 20-25 °С в течение 5 мин. При отсутствии центрифуги, обеспечивающей режим центрифугирования 20000 g, удаляют верхний слой жира пластиковым шпателем, после чего фильтруют оставшийся водный слой через складчатый фильтр.

В отдельные пробирки вносят по 450 мкл буфера 1 для разбавления градуировочных растворов и прибавляют по 50 мкл надосадочного слоя или фильтрата пробы сыра. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 24.

6.5 Масло

Образец масла охлаждают до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Навеску массой 1,0 г помещают в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл и выдерживают на водяной бане при температуре 40-45 °С до полного расплавления масла. Сразу же после расплавления в пробирки добавляют 1 мл гексана и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Добавляют 1 мл раствора метанола (2:8 по объему) и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 20 с, а затем на шейкере

или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин. Пробу центрифугируют 10 минут при 2000 g и температуре 4 °С. Осторожно удаляют верхний гексановый слой пипеткой Пастера.

В пробирки снова добавляют 1 мл гексана и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 1 мин с. Центрифугируют пробы 10 минут при 2000 g и температуре 4 °С, после чего осторожно удаляют верхний гексановый слой пипеткой Пастера.

Переносят 1,0 мл водного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл и помещают на лед. Выдерживают пробы 15 мин и проводят центрифугирование при 20000 g и температуре 20-25 °С в течение 5 мин. При отсутствии центрифуги, обеспечивающей режим центрифугирования 20000 g, проводят центрифугирование при 4000 g, после чего фильтруют оставшийся водный слой через складчатый фильтр.

В отдельные пробирки вносят по 800 мкл буфера 1 для разбавления градуировочных растворов и прибавляют по 50 мкл водной фазы пробы. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения зависит от жирности масла: 19,5 (масло 82,5 %, 84 % жирности); 20,5 (масло 75 %, 78 % жирности); 21,5 (масло 70 %, 72,5 % жирности); 22,5 (масло 65 %, 67 % жирности); 25 (масло 50 % жирности).

6.6 Сгущенное молоко

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Навеску массой 25,0 г помещают в стаканы вместимостью 150 мл, добавляют порциями дистиллированную воду, нагретую до температуры 30 °С, и перемешивают содержимое стеклянной палочкой до образования однородной смеси. Затем переносят растворенное молоко в мерные колбы на 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой.

Далее пробы сгущенного молока подвергают процедуре обезжиривания, согласно п.6.2.1, проводя центрифугирование в режиме: 10 мин при 3000 g и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая пробы молока до температуры 2-4 °С.

Шпателем удаляют верхний жировой слой. Отбирают 2 мл обезжиренного молока чистым наконечником и переносят в чистую пробирку. Для восстановленного обезжиренного сгущенного молока процедуру по удалению жира не производят.

В отдельные пробирки вносят по 450 мкл буфера 2 для разбавления градуировочных растворов и прибавляют по 50 мкл проб обезжиренного сгущенного молока. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 40.

6.7 Творог, творожные продукты и кисломолочные продукты

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают. При наличии в образцах частиц твердой консистенции их отбрасывают.

Образцы гомогенизируют и вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл продукты массой 5,0 г, пробирки выдерживают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 15 мин, после чего сразу перемешивают на вортексе до образования гомогенной смеси. Пробы центрифугируют в режиме: 10 мин при 4000 g и 10 °С. При

отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая пробы молока до температуры 2-4 °С.

В отдельные пробирки вносят по 1000 мкл буфера 2 для разбавления градуировочных растворов (для проб сметаны жирностью выше 15 % и творога жирностью выше 5 %) и 900 мкл (для остальных продуктов) и прибавляют по 100 мкл анализируемых проб продуктов. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 10.

6.8 Яйца (сырое цельное яйцо и яичный порошок)

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Яйцо освобождают от скорлупы и гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Образец яичного порошка перемешивают и восстанавливают в соответствии с ГОСТ 30364.0 п.5.2.2.

В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл вносят 4,0 г гомогенизированного сырья или восстановленного продукта, добавляют 20 мл 50 мМ раствора янтарной кислоты, приготовленной в соответствии с п. 5.3.3. Пробы перемешивают 15 минут на шейкере или при переворачивании на ротаторе и центрифугируют 15 минут при 4000 g и температуре (20-25) °С.

В отдельные пробирки вносят по 900 мкл 20 мМ фосфатного буферного раствора, приготовленного по п.5.3.1, и прибавляют по 100 мкл надосадочной жидкости. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 60.

6.9 Мед

Доводят температуру образца до 20 °С, выдерживая его при комнатной температуре

Для приготовления пробы меда в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл вносят 1,0 г образца меда и добавляют 49 мл 20 мМ фосфатного буфера, тщательно перемешивают на вортексе в течение 2 мин. Полученный раствор используют для анализа. Перед использованием пробирки с пробами требуется хорошо встряхнуть, несколько раз перевернув их. Фактор разведения 50.

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

7.1 Перед проведением ИФА компоненты тест-системы и исследуемые пробы выдерживают при комнатной температуре (20–25) ºС в течение 30 мин. Перед использованием реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием.

7.2 Приготовление рабочего моющего буфера

Содержимое флакона с концентратом моющего буфера интенсивно встряхивают в течение (10-20) с, в случае образования кристаллов – подогревают на водяной бане или помещают в ультразвуковую баню. Разводят нужный объем раствора в 10 раз (соотношение по объему 1+9) дистиллированной водой. Для этого в мерный стакан (цилиндр) отбирают необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов, доводят дистиллированной водой до нужного объема и перемешивают полученный рабочий раствор. Приготовленный раствор можно хранить при (2-8) ºС в течение 1 месяца.

7.3 Приготовление градуировочных растворов

Концентраты градуировочных растворов разводят в 10 раз (соотношение по объему 1+9) буфером 1 при исследовании проб мяса и мясных продуктов, проб рыбы, сыра, масла, яиц и меда. Для исследования проб молока и молочных продуктов (восстановленное сухое молоко, молочная сыворотка, восстановленная молочная сыворотка, мороженое, творог, творожные продукты, кисломолочные продукты, сгущенное молоко) концентраты градуировочных растворов разводят на буфере 2.

Для этого в чистые стеклянные пробирки или флаконы, промаркированные номерами приготавливаемых рабочих градуировочных растворов от C_1 до C_6 , вносят по 450 мкл соответствующего буфера для разведения градуировочных растворов. Затем отбирают по 50 мкл каждого концентрата градуировочного раствора и вносят в соответствующую пробирку или флакон. Для каждого раствора используют чистый наконечник. Тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

Получают градуировочные растворы, содержащие тетрациклин:
C_1 – 0 мкг/л; C_2 – 0,05 мкг/л; C_3 – 0,15 мкг/л; C_4 – 0,3 мкг/л; C_5 – 0,6 мкг/л; C_6 – 1,8 мкг/л.

Исходные концентраты градуировочных растворов после отбора аликвот для разведения, следует сразу же поместить в холодильник.

При каждой постановке ИФА следует приготовить новые градуировочные растворы.

7.4 Приготовление хромоген-субстратного раствора.

ВНИМАНИЕ! Хромоген-субстратный раствор готовят в темных стеклянных или пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Раствор хромогена разводят субстратом в 21 раз (соотношение по объему 1+20) из расчета 100 мкл на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон из темной пластмассы вместимостью 20 мл вносят необходимое количество субстрата, добавляют соответствующее количество раствора хромогена и интенсивно перемешивают в течение (30-40) с.

Примечание: субстрат и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.

Приготовленный или поставленный в тест-системе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

7.5 Подготовка иммуносорбента

Планшетный иммуносорбент освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку. Не рекомендуется одновременно использовать более 6 стрипов. При необходимости исследовать большее количество проб анализ выполняется в несколько этапов.

Лунки маркируют следующим образом: C_1 – 2 лунки, C_2 – 2 лунки, C_3 – 2 лунки, C_4 – 2 лунки, C_5 – 2 лунки, C_6 – 2 лунки, X_i – по 2 лунки (таблица 2).

Таблица 2 – Схема маркировки лунок для ИФА

	1	2	3	4	5	6
A	C_1	C_5	X_3	X_7	…	
B	C_1	C_5	X_3	X_7	…	
C	C_2	C_6	X_4	X_8		
D	C_2	C_6	X_4	X_8		
E	C_3	X_1	X_5	X_9		
F	C_3	X_1	X_5	X_9		
G	C_4	X_2	X_6	X_{10}		
H	C_4	X_2	X_6	X_{10}		

Примечание – C_1 – C_6 – лунки для градуировочных растворов, X_i – лунки для исследуемых проб продуктов.

При анализе используют две параллельные пробы (навески) каждого образца продукта.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Отбирают по 50 мкл раствора из каждого флакона (пробирки) с рабочими градуировочными растворами C_1-C_6 (в порядке возрастания их концентраций), а также из пробирок с исследуемыми пробами продуктов и вносят в лунки в соответствии с их маркировкой.

8.2 Во все лунки вносят по 50 мкл раствора антител. Перемешивают содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола.

ВНИМАНИЕ! Суммарное время внесения всех реагентов по пп. 8.1 и 8.2 не должно превышать 15 минут с тем, чтобы минимизировать возможные артефакты, обусловленные разным временем протекания иммунохимической реакции в первых и последних лунках.

8.3 Планшет заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при комнатной температуре (20-25) ^oC в течение 1 ч.

8.4 После окончания инкубации проводят 3-кратную промывку планшета приготовленным моющим буфером (п. 7.2) с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки, добавляя в каждую лунку по 250 мкл раствора. При ручной промывке удаляют содержимое из всех лунок путем резкого переворачивания планшета или аспирации, затем все лунки промывают 3 раза моющим буфером и удаляют остатки влаги, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

Необходимо соблюдать следующие требования к промыванию планшета:

- при использовании автоматического или полуавтоматического устройства выполнять промывку в соответствии с прилагаемой программой;
- на всех этапах промывания контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости из них;
- не допускать переполнения лунок и перетекания жидкости между ними;
- выдерживать лунки, заполненным раствором для отмывания, не менее 10 с;

Некачественное промывание планшета приводит к получению высокого фонового сигнала и некорректным результатам измерений.

8.5 В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл раствора коньюгата вторых антител с пероксидазой.

8.6 Планшет заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при комнатной температуре (20-25) ^{o}C в течение 15 мин.

8.7 После окончания инкубации проводят 3-кратную промывку планшета приготовленным моющим буфером (п. 7.2) с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки, добавляя в каждую лунку по 250 мкл раствора. При ручной промывке удаляют содержимое из всех лунок путем резкого переворачивания планшета или аспирации, затем все лунки промывают 3 раза моющим буфером и удаляют остатки влаги, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

8.8 В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора (п. 7.4) или готового реагента из тест-системы. Аккуратными круговыми движениями перемешивают содержимое лунок. Общее время добавления не должно превышать 2 минут. Планшет заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при (20-25) ^{o}C в темноте в течение 15 минут.

8.9 Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента в той же последовательности и с той же скоростью, которые использовались при добавлении хромоген-субстратного раствора. Перемешивают содержимое лунок круговым движением планшета по ровной поверхности лабораторного стола. Растворы в лунках должны окраситься в желтый цвет.

8.10 В течение не более 15 минут после остановки реакции измеряют в планшетном спектрофотометре ОП растворов в лунках при длине волны 450 нм.

9. РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

9.1 Расчеты без использования программного обеспечения

Рассчитывают средние арифметические значения ОП (B_i) для каждой пары лунок, содержащих градуировочные растворы – C_1 - C_6 и параллельные пробы исследуемых образцов продуктов – X_i.

Строят градуировочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая по линейной оси ординат значения ОП в о. е. или B_i/B_0, в процентах, а по логарифмической оси абсцисс – значения концентраций тетрациклина, выраженные в мкг/л в соответствующих градуировочных растворах.

По градуировочному графику определяют содержание тетрациклина в исследуемых образцах продуктов (градуировка оси абцисс в мкг/л соответствует содержанию антибиотика в мкг/кг или ppb). При окончательных расчетах следует найденную по градуировочной кривой величину умножить на фактор разведения пробы.

Примечания:

1 Биологический матрикс проб исследуемых образцов продуктов оказывают неспецифическое ингибирующее действие на связывание антител с иммобилизованным белковым коньюгатом тетрациклина. Это проявляется в снижении ОП или B_i/B_0 в лунках с пробами исследуемых продуктов, которые заведомо не содержат тетрациклин. Измерение кажущихся концентраций холостых образцов C_x и расчет стандартных отклонений (SD) позволяют найти предел обнаружения ПО = C_x + 3SD и предел количественного определения ПКО = C_x + 6 SD.

2 Пробы со значениями концентраций ниже предела количественного определения следует рассматривать как отрицательные в отношении содержания тетрациклина.

9.2 Расчеты с использованием программного обеспечения

Обработку результатов измерений можно производить с помощью программного обеспечения "RIDA Soft", разработанного R-Biopharm AG (Германия) при технической помощи официального представителя ОДО «КомПродСервис».

10 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

10.1 Параметры ИФА градуировочных растворов: связывание тетрациклина и конъюгата: B_0 – от 1,3 до 2,3 о.е; B_1/B_0 – от 70 до 95 %, B_5/B_0 – от 5 до 35 % .

10.2 Чувствительность: минимальная концентрация тетрациклина в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью тест-системы (B_0 – 2 SD), не превышает 0,05 мкг/л.

10.3 Коэффициент вариации результатов измерений концентрации тетрациклина в пробах в одной постановке ИФА не превышает 15 %.

10.4 Специфичность. В тест-системе при анализе используются высокоспецифичные антитела, проявляющие перекрестную чувствительность к антибиотикам группы тетрациклина. Относительно тетрациклина (100 %) значения кросс-реактивностей хлортетрациклина – 70 %, ролитетрациклина – 34 %, демеклоциклина – 26 %, окситетрациклина – 13 %, миноциклина –3 %, доксициклина – 2%.

10.5 Извлечение (открытие) добавки тетрациклина в холостом образце продукта – не менее 80 %.

10.6 Пределы количественного определения представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Пределы количественного определения тетрациклина в различных видах сырья и продукции животного происхождения

Продукт	ПКО, мкг/кг
Мясо, рыба, продукты из рыбы	2,0
Готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, жиры животные, шпик, консервы мясные и мясорастительные	5,0
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное молоко, молочные смеси для детского питания, мороженое на молочной основе	0,5
Молочная сыворотка, восстановленная молочная сыворотка	3,0
Сгущенное молоко	4,0
Кисломолочные продукты	2,0
Творог, творожные продукты	2,0
Сыр	4,0
Масло сливочное	3,0
Яйцо, яичный порошок	6,0
Мед	4,0

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

11.1 Тест-система должна храниться в упаковке изготовителя при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Допустимо хранение тест-системы при

температуре до 25 °С не более 3 суток. Замораживание тест-системы и отдельных компонентов не допускается.

11.2 Неиспользованные стрипы должны храниться в герметично закрытом полиэтиленовом пакете с осушителем при температуре (2-8) °С не более 6 месяцев.

11.3 Концентраты градуировочных растворов, моющего буфера, а также растворы антител и коньюгата, буферные растворы 1 и 2 для разведения проб, субстрат, хромоген и стоп-реагент после вскрытия флаконов и последующей укупорки можно хранить при температуре (2-8) °С в течение срока годности тест-системы.

11.4 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению тест-системы. Следует иметь в виду, что при каждой постановке ИФА необходимо построение своего независимого градуировочного графика.

КомПродСервис
Техническая поддержка и прием заявок:
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50,
info@komprod.com,
support@komprod.com