

ПРОДОСКРИН® Бацитрацин

Набор реагентов для определения бацитрацина в продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

Версия 1.0

РАЗРАБОТАНО

Институт биоорганической химии

НАН Беларуси

ТУ ВУ 100185129.168-2019



Видеоинструкция на YouTube:

<https://www.youtube.com/watch?v=g06AvPi4Dec>

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, по вопросам технической поддержки и дополнительной информации обращайтесь к производителю или официальному дистрибьютору на территории Вашей страны:



Производитель:
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

Официальный дистрибьютор в России:

ООО "НеоТест"
ул. РаSTOPчина, 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



ПРОДОСКРИН® Бацитрацин

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин предназначена для скрининговых исследований содержания остаточных количеств антибиотика бацитрацина и его аналога Zn-бацитрацина в пищевых продуктах и продовольственном сырье животного происхождения методом иммуноферментного анализа.

1.2 Бацитрацин, относящийся к группе пептидных антибиотиков, применяется в ветеринарной медицине и широко используется в животноводстве в составе кормовых добавок в качестве профилактического и ростостимулирующего средства при выращивании и откорме сельскохозяйственных животных и птиц. Известно, что длительное использование в пищу продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, может вызывать побочные эффекты, опасные для здоровья человека. Так, бацитрацин обладает сильным нефротоксическим действием. Поэтому существует законодательное регулирование предельно допустимых уровней этого антибиотика в продовольствии, и количественное определение бацитрацина является обязательным при контроле содержания вредных веществ в мясных, рыбных и некоторых других пищевых продуктах.

1.3 Тест-система рассчитана на проведение анализа в параллелях 42 анализируемых проб и 6 градуировочных растворов при использовании всех стрипов одновременно, всего 96 определений. При необходимости тест-система может быть разделена на 3-4 независимые части с различным количеством определяемых проб. Для каждой постановки необходимо построение нового градуировочного графика. Продолжительность анализа составляет 80-90 минут без учета пробоподготовки.

Диапазон измерений массовой доли бацитрацина в мясе, в т.ч. птицы (мышечная ткань), мясных и мясосодержащих продуктах, субпродуктах, в т.ч. птичьих, продуктах их переработки, сале, в т.ч. шпике, молоке, пищевой продукции аквакультуры животного происхождения (рыбе, креветках), яйцах птицы, сухих¹ и жидких яичных продуктах, меде составляет от 9,0 до 405,0 мкг/кг.

Предел измерений составляет 9,0 мкг/кг.

1 Здесь и далее по тексту результат измерений массовой доли бацитрацина в сухих яичных продуктах относится к восстановленному продукту

2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2.1 В состав набора входят следующие компоненты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Состав тест-системы

	Компонент	Количество
1	Иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
2	Градуировочные растворы С ₀ , С ₁ , С ₂ , С ₃ , С ₄ и С ₅ со значениями концентрации бацитрацина – 0; 0,50; 1,00; 3,00; 9,00 и 27,00 нг/мл, готовы к использованию	6 флаконов по 0,7 мл
3	Буфер для экстракции 1	1 флакон, 20 мл
4	Буфер для экстракции 2	1 флакон, 20 мл
5	Конъюгат, 21-кратный концентрат	1 пробирка, 0,7 мл
6	Буфер для разбавления	1 флакон, 25 мл
7	Моющий буфер, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл
8	Хромоген	1 флакон, 0,7 мл
9	Субстрат	1 флакон, 14 мл
10	Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл
Примечание – В случае поставки хромоген-субстратного раствора в готовом к использованию виде компонентом тест-системы является хромоген-субстратный раствор, объемом 14 мл.		

2.2 Принцип работы тест-системы. В тест-системе ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин использован метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее – ИФА). Бацитрацин экстрагируют из образца метанольно-буферным раствором. В лунки планшета вносят градуировочные растворы с известной концентрацией бацитрацина или подготовленные к анализу растворы проб, добавляют рабочий раствор конъюгата бацитрацина с пероксидазой из корней хрена. Во время последующей инкубации бацитрацин в составе градуировочного раствора или анализируемой пробы конкурирует с конъюгатом за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок иммуносорбента. После промывки в лунки добавляют хромоген-

субстратный раствор, который под действием фермента в составе связанного с антителами конъюгата превращается в окрашенный продукт, количество которого обратно пропорционально содержанию бацитрацина в анализируемом образце или градуировочном растворе. Затем добавляют стоп-реагент, останавливающий ферментативную реакцию и одновременно изменяющий окраску раствора с голубой на желтую. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на многоканальном планшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. На основании значений оптической плотности компьютерная программа строит градуировочный график и автоматически рассчитывает массовую долю бацитрацина в исследуемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

3.1 При работе с тест-системой следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

3.2 Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с анализируемыми образцами, экстрактами и растворами для градуировки, так как они содержат бацитрацин, обладающий токсическим действием.

Метанол, входящий в состав экстрагирующего раствора, является сильным ядом. Не допускайте его контактов с кожей и глазами. В случае попадания на тело немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды.

Стоп-реагент содержит разбавленную серную кислоту, которая обладает раздражающим действием. В случае попадания на кожу и слизистые оболочки пораженный участок следует немедленно промыть большим количеством проточной воды.

3.3 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 При работе следует надевать халат и одноразовые пластиковые или резиновые перчатки.

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

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

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

4.1 Реагенты тест-системы, экстракты проб, градуировочные и другие растворы, используемые в анализе, необходимо отбирать отдельными наконечниками к пипетке.

4.2 Не допускается использование тест-системы после окончания срока годности.

4.3 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из разных серий данной тест-системы или отдельные компоненты из тест-систем других изготовителей.

4.4 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная стеклянная емкость. Вся используемая для приготовления реагентов стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта хромовой смесью и многократно промыта водопроводной водой и сполоснута дистиллированной водой.

4.5 Необходимо обратить внимание на тщательное, но аккуратное перемешивание содержимого каждого компонента. Во всех случаях следует избегать образования пены.

4.6 Если выполнение ИФА начато, то все последовательные стадии следует заканчивать, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени и выдерживая установленную продолжительность инкубации. Следует исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

4.7 Во время проведения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности или держать компоненты на ярком свете во время инкубации или хранения.

4.8 Необходимо использовать микропланшетный фотометр и дозаторы пипеточные переменного объема, поверенные государственной метрологической службой.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

Автоматический микропланшетный фотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, с пределом допускаемой погрешности измерения оптической плотности не более 5 %.

Весы лабораторные высокого II класса точности с наибольшим пределом взвешивания не более 200 г и погрешностью взвешивания не более $\pm 0,01$ г.

Водяная баня, обеспечивающая поддержание температуры 37 и 60 °С с точностью ± 5 °С.

Гомогенизатор или бытовой блендер.

Центрифуга лабораторная с охлаждением до плюс 4 °С, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 2000 g (для центрифужных пробирок вместимостью 15 мл).

Магнитная мешалка, частота вращения до 500 об/мин.

Лабораторный встряхиватель с переворачиванием (ротатор), диапазон регулирования скорости (0-100) об/мин.

Лабораторный вихревой смеситель (вортекс), обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин.

Восьмиканальный пипет-дозатор со сменными одноразовыми наконечниками с диапазоном объема дозирования от 5 до 300 мкл с дискретностью дозирования 1,0 мкл и погрешностью дозирования $\pm 3\%$.

Одноканальные пипет-дозаторы со сменными одноразовыми наконечниками с диапазоном объемов дозирования: от 5 до 50 мкл с дискретностью дозирования 0,5 мкл и погрешностью дозирования $\pm 3,0\%$; от 20 до 200 мкл с дискретностью дозирования 1,0 мкл и погрешностью дозирования $\pm 1,5\%$; от 100 до 1000 мкл с дискретностью дозирования 5,0 мкл и погрешностью дозирования $\pm 1,5\%$.

Секундомер электронный.

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 25 °С.

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 18 °С в морозильной камере.

Колбы конические вместимостью 50 и 100 мл, снабженные пластмассовыми или стеклянными пробками.

Стаканы вместимостью 50, 100 и 500 мл.

Палочки стеклянные оплавленные.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 мл с крышкой.

Пробирки стеклянные вместимостью 5 мл или пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 1,5 или 2 мл.

Цилиндры мерные вместимостью 25, 50 или 100 мл.

Стеклянные емкости с плотно закрывающимися крышками вместимостью 250 и 100 мл.

Пленка «парафильм», скотч или крышка из полистирола для микротитровального планшета.

Чашки Петри стеклянные многоразовые диаметр 100 мм, высота 15 мм или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканального дозатора.

Штатив для пробирок.

Бумага индикаторная универсальная.

Бумага фильтровальная.

Флаконы из пластмассы с завинчивающейся крышкой.

Вода дистиллированная или деионизованная

Метанол.

Примечание - Допускается применение другого оборудования и реактивов, не уступающих по своим свойствам и качеству приведенным выше.

6 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

6.1 Приготовление экстрагирующей смеси.

Для экстракции мяса, в т.ч. птицы, мясных, мясосодержащих продуктов, субпродуктов, в т.ч. птичьих, продуктов их переработки, сала, в т.ч. шпика, пищевой продукции аквакультуры животного происхождения (рыбы, креветок), меда экстрагирующую смесь № 1 приготавливают с использованием буфера для экстракции 1.

Для экстракции яиц птицы, сухих и жидких яичных продуктов экстрагирующую смесь № 2 приготавливают с использованием буфера для экстракции 2.

В коническую колбу вместимостью 50 или 100 мл (в зависимости от приготавливаемого объема) вносят отмеренную дозатором или цилиндром аликвоту буфера для экстракции 1 или буфера для экстракции 2 и добавляют отмеренный цилиндром в четыре раза больший объем метанола, после чего колбу закрывают пробкой и содержимое перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

6.2 Приготовление рабочего раствора моющего буфера.

Содержимое флакона с концентратом моющего буфера интенсивно встряхивают в течение 10-20 с. В случае образования кристаллов помещают флакон на водяную баню при температуре 37 °С и выдерживают до полного растворения кристаллов.

Рабочий моющий буфер готовят в стакане вместимостью 500 мл, в который вносят отмеренную дозатором или цилиндром аликвоту концентрата моющего буфера и добавляют отмеренный цилиндром в девять раз больший объем дистиллированной воды, после чего содержимое стакана перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную или пластмассовую емкость с плотно закрывающейся пробкой.

Срок хранения раствора при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С – 1 мес.

6.3 Приготовление рабочего раствора конъюгата

В пробирку или флакон вносят отмеренную дозатором аликвоту буфера для разбавления и добавляют отмеренную дозатором в 20 раз меньшую по объему аликвоту концентрата конъюгата, после чего содержимое пробирки или флакона перемешивают, не допуская образования пены.

Объем рабочего раствора конъюгата должен быть приготовлен из расчета 50 мкл рабочего раствора конъюгата на каждую лунку.

Рабочий раствор конъюгата перемешивают круговыми движениями, не допуская образования пены.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

6.4 Приготовление хромоген-субстратного раствора

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

Во флакон вносят отмеренную дозатором аликвоту субстрата и добавляют отмеренную дозатором в 20 раз меньшую по объему аликвоту хромогена, после чего содержимое флакона интенсивно перемешивают в течение (30-40) с.

Объем хромоген-субстратного раствора должен быть приготовлен из расчета 100 мкл на каждую лунку.

Примечание – Субстрат и хромоген могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента – хромоген-субстратного раствора.

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 ОТБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРОБ

7.1 Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С в течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 20 °С в течение 14 дней.

Перед проведением подготовки проб замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

7.2 Подготовка проб

7.2.1 Подготовка мяса, в т.ч. птицы, мясных и мясосодержащих продуктов, субпродуктов, в т.ч. птичьих, и продуктов их переработки, сала, в т.ч. шпика.

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 7.1, до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды. Удаляют из образца несъедобные части, в том числе грубые и кальцинированные сухожилия, костную ткань, оболочку готовых к употреблению мясных продуктов. Подготовленные образцы гомогенизируют с помощью блендера или гомогенизатора.

При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения. Взвешивают (1,00±0,01) г гомогенизированного образца. Навеску исследуемой пробы помещают в центрифужную пробирку с пробкой вместимостью 15 мл. В пробирку добавляют отмеренные дозатором 2 мл раствора экстрагирующей

смеси №1, приготовленной по п. 6.1. Важно соблюдать соотношение масса образца : объем экстрагирующей смеси = 1:2.

Пробирку закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают в течение 15 мин вручную или на ротаторе при частоте вращения 50 об/мин путем переворачивания вверх-вниз. Пробу центрифугируют в течение 10 минут при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и относительном центробежном ускорении 2000 g. Супернатант используют для приготовления раствора пробы.

Отбирают дозатором аликвоту супернатанта объемом 50 мкл и переносят ее в стеклянную пробирку вместимостью 5 мл или в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф. В пробирку с аликвотой супернатанта добавляют отмеренные дозатором 200 мкл буфера для разбавления. Раствор перемешивают вручную или на вортексе, закрывают пробирку пробкой.

Полученные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 1 часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

7.2.2 Подготовка молока

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 7.1, до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, после чего образец перемешивают путем встряхивания и переворачивания упаковки. Контроль рН молока проводят по универсальной индикаторной бумаге, доводя до значения 6-7, используя 0,1 М раствор гидроксида натрия.

От образца молока дозатором отбирают две параллельные пробы объемом 10 мл и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл. Центрифугируют пробы в течение 10 мин при температуре плюс 4 °С и относительном центробежном ускорении 2000 g.

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

Шпателем удаляют верхний жировой слой.

Отбирают дозатором аликвоту обезжиренного молока объемом 20 мкл и переносят ее в стеклянную пробирку вместимостью 5 мл или в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф. В пробирку добавляют отмеренные дозатором 280 мкл буфера для разбавления. Раствор перемешивают вручную или на вортексе, закрывают пробирку пробкой.

Полученные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 1 часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

7.2.3 Подготовка пищевой продукции аквакультуры животного происхождения (рыбы, креветок).

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 7.1, до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды. Удаляют из образца несъедобные части, в том числе костную ткань, плавники, чешую, внутренние органы. Используют мышечную ткань рыбы в естественной пропорции с кожей. Подготовленные образцы гомогенизируют с помощью блендера или гомогенизатора.

При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения. Взвешивают $(1,00 \pm 0,01)$ г гомогенизированного образца. Навеску исследуемой пробы помещают в центрифужную пробирку с пробкой вместимостью 15 мл. В пробирку добавляют отмеренные дозатором 2 мл раствора экстрагирующей смеси №1, приготовленной по п. 6.1. Важно соблюдать соотношение масса образца : объем экстрагирующей смеси = 1:2.

Пробирку закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают в течение 15 мин вручную или на ротаторе при частоте вращения 50 об/мин путем переворачивания вверх-вниз. Пробу центрифугируют в течение 10 минут при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и относительном центробежном ускорении 2000 g. Супернатант используют для приготовления раствора пробы.

Отбирают дозатором аликвоту супернатанта объемом 50 мкл, и переносят ее в стеклянную пробирку вместимостью 5 мл или в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф. В пробирку с аликвотой супернатанта добавляют отмеренные дозатором 200 мкл буфера для разбавления. Раствор перемешивают вручную или на вортексе, закрывают пробирку пробкой.

Полученные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 1 часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

7.2.4 Подготовка яиц птиц, сухих и жидких яичных продуктов.

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 7.1, до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

Яйца освобождают от скорлупы и гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

Жидкие яичные продукты гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

Сухие яичные продукты перед отбором навесок тщательно перемешивают. Восстановление продукта проводят по п. 5.2.2 ГОСТ 30364.0 или следующим образом. Взвешивают $(1,00 \pm 0,01)$ г сухого яичного продукта. Навеску

исследуемого образца помещают в стакан вместимостью 50 мл и добавляют 4 мл дистиллированной воды температурой от плюс 20 °С до плюс 25 °С. Содержимое стакана тщательно перемешивают стеклянной палочкой до образования однородной пасты и оставляют на 15 мин до набухания.

При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения. Взвешивают $(1,00 \pm 0,01)$ г гомогенизированного образца яиц, жидкого яичного продукта или восстановленного сухого яичного продукта. Навеску исследуемой пробы помещают в центрифужную пробирку с пробкой вместимостью 15 мл. В пробирку добавляют отмеренные дозатором 2 мл раствора экстрагирующей смеси №2, приготовленной по п. 6.1. Важно соблюдать соотношение масса образца : объем экстрагирующей смеси = 1:2.

Пробирку закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают в течение 15 минут вручную или на ротаторе при частоте вращения 50 об/мин путем переворачивания вверх-вниз. Пробу центрифугируют в течение 10 минут при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и относительном центробежном ускорении 2000 g. Супернатант используют для приготовления раствора пробы.

Отбирают дозатором аликвоту супернатанта объемом 50 мкл, и переносят ее в стеклянную пробирку вместимостью 5 мл или в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф. В пробирку с аликвотой супернатанта добавляют отмеренные дозатором 200 мкл буфера для разбавления. Раствор перемешивают вручную или на вортексе, закрывают пробирку пробкой.

Полученные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 1 часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

7.2.5 Подготовка меда

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 7.1, до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, после чего образец перемешивают.

При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения. Взвешивают $(1,00 \pm 0,01)$ г образца. Навеску исследуемой пробы помещают в центрифужную пробирку с пробкой вместимостью 15 мл. Помещают пробирку с пробой на водяную баню и выдерживают 10 минут при 60 °С. После охлаждения до температуры окружающей среды в пробирку добавляют отмеренные дозатором 2 мл раствора экстрагирующей смеси №1, приготовленной по п. 6.1. Важно соблюдать соотношение масса образца : объем экстрагирующей смеси = 1:2.

Пробирку закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают в течение 15 минут вручную или на ротаторе при частоте вращения 50 об/мин путем переворачивания вверх-вниз. Пробу центрифугируют в течение 10 минут

при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и относительном центробежном ускорении 2000 g. Супернатант используют для приготовления раствора пробы.

Отбирают дозатором аликвоту супернатанта объемом 50 мкл, и переносят ее в стеклянную пробирку вместимостью 5 мл или в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф. В пробирку с аликвотой супернатанта добавляют отмеренные дозатором 200 мкл буфера для разбавления. Раствор перемешивают вручную или на вортексе, закрывают пробирку пробкой.

Полученные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 1 часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

8.1 Перед проведением ИФА тест-систему извлекают из холодильника и, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают от 0,5 до 1 ч при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С. Доводят температуру остальных реагентов до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

Растворы из тест-системы следует готовить непосредственно перед проведением ИФА. Перед использованием реагенты необходимо аккуратно перемешать круговыми движениями флаконов.

8.2 Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленными в соответствии с п. 8.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок. Неиспользованные стрипы микротитровального планшета (иммуносорбента) следует хранить упакованными в плотно закрытом фольгированном пакете в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб в микропланшетах согласно таблице 2, с учетом того, что для каждого градуировочного раствора требуются две лунки и по одной лунке для параллельных проб образца.

Таблица 2– Схема расположения лунок

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	С ₀	С ₀	П ₃	П ₃	П ₁₁	П ₁₁						
В	С ₁	С ₁	П ₄	П ₄	П ₁₂	П ₁₂						
С	С ₂	С ₂	П ₅	П ₅	П ₁₃	П ₁₃						
Д	С ₃	С ₃	П ₆	П ₆	П ₁₄	П ₁₄						
Е	С ₄	С ₄	П ₇	П ₇	П ₁₅	П ₁₅						
Ф	С ₅	С ₅	П ₈	П ₈	П ₁₆	П ₁₆						
Г	П ₁	П ₁	П ₉	П ₉	П ₁₇	П ₁₇						
Н	П ₂	П ₂	П ₁₀	П ₁₀	П ₁₈	П ₁₈						

Примечания – С₀ – С₅ – градуировочные растворы в лунках, П₁ – П₁₈ – растворы проб образцов 1-18 в лунках.

Для проведения исследований рекомендуется использовать восьми-канальную пипетку. Не следует использовать более 6 стрипов в одной группе исследований.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1 В лунки планшета в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят аликвоты объемом по 50 мкл каждого градуировочного раствора в порядке возрастания их концентраций и аликвоты объемом 50 мкл двух параллельных проб каждого исследуемого образца, приготовленных в соответствии с п. 7.2.

9.2 В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранный дозатором рабочий раствор конъюгата, приготовленный по п. 6.3, объемом 50 мкл. Аккуратными круговыми движениями микротитровального планшета по поверхности стола перемешивают содержимое лунок. Встряхивания, постукивания планшетом по столу не допустимы.

9.3 Микротитровальный планшет закрывают изолирующим листком, скотчем или крышкой и инкубируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 60 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет.

По окончании времени инкубации аккуратно удаляют пленку, скотч или крышку, закрывающие лунки. Растворы из всех лунок выливают путем резкого переворачивания микротитровального планшета.

9.4 В пластмассовую кювету для моющего буфера вносят рабочий раствор моющего буфера, приготовленный по п. 6.2, в объеме из расчета 7,5 мл на один

стрип. Затем с применением восьмиканального дозатора проводят трехкратное промывание планшета рабочим раствором моющего буфера порциями по 300 мкл на одно промывание каждой лунки.

При промывании планшета: контролируют заполнение всех лунок и полное удаление рабочего раствора моющего буфера; не допускают переполнения лунок и перетекания рабочего раствора моющего буфера между ними; выдерживают лунки, заполненные рабочим раствором моющего буфера, не менее 10 с.

Рекомендуется проводить процедуру промывки микротитровального планшета с помощью устройства для промывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – 3, объем используемого рабочего раствора моющего буфера – 300 мкл.

После последнего промывания микротитровальный планшет переворачивают и удаляют остатки рабочего раствора моющего буфера постукиванием планшетом по ровной поверхности стола, покрытой сухим листом фильтровальной бумаги.

9.5 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят хромоген-субстратный раствор, приготовленный в соответствии с п.6.4, в объеме из расчета 1 мл на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрывают микротитровальный планшет пленкой, скотчем или крышкой и инкубируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 15 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет.

Не допускается выливать обратно в оригинальный флакон остатки хромоген-субстратного раствора во избежание его контаминации.

9.6 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят стоп-реагент в объеме из расчета 1 мл на стрип.

По истечении времени инкубации аккуратно удаляют пленку, скотч или крышку и в каждую лунку микротитровального планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл стоп-реактанта. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 В течение не более 15 мин после добавления стоп-реактанта измеряют оптическую плотность в каждой лунке микротитровального планшета на автоматическом микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Измерения приводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Для построения градуировочного графика и расчета массовой доли бацитрацина в анализируемых образцах используют прилагаемый шаблон в Microsoft Excel, поставляемый к тест-системе на компакт-диске по запросу, или программное обеспечение стороннего производителя (например, встроенное программное обеспечение микропланшетного фотометра), после внесения необходимых параметров данного ИФА.

10.2 В соответствующие графы разделов I и II шаблона вносят полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов C_0 - C_5 и растворов проб.

Программа Excel с применением прилагаемого шаблона на основании внесенных оператором значений оптической плотности, полученных по п. 9.7, автоматически рассчитывает процент связывания для градуировочных растворов C_1 - C_5 и для раствора пробы относительно градуировочного раствора C_0 с концентрацией 0 нг/мл бацитрацина:

$$\frac{B_i}{B_0} \cdot 100\%, \frac{B_x}{B_0} \cdot 100\%$$

где B_0 – средняя оптическая плотность градуировочного раствора C_0 ;

B_i – средняя оптическая плотность i -го градуировочного раствора ($i = 1, 2, 3, 4, 5$);

B_x – оптическая плотность раствора пробы.

Программой Excel автоматически строится градуировочная зависимость B_i/B_0 , %, от натурального логарифма концентрации C_i , нг/мл, где C_i – концентрация бацитрацина в градуировочном растворе, выраженная в нг/мл, и рассчитывается массовая доля бацитрацина, мкг/кг, в исследуемых пробах с учетом фактора разбавления пробы, равного 15.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов измерений двух параллельных проб одного образца, при этом полученный результат округляют до первого десятичного числа.

11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАБОРА

11.1 Параметры ИФА для градуировочных растворов – связывание конъюгата бацитрацина с пероксидазой: B_0 – от 1,3 до 2,7 о.е; B_1/B_0 – не более 96 %, B_5/B_0 – не более 40 %.

11.2 Чувствительность: минимальная концентрация бацитрацина в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью тест-системы, не превышает 0,5 нг/мл.

11.3 Специфичность. В тест-системе ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин при изготовлении иммуносорбента используются высокоспецифичные антитела. Кросс-реактивность используемой антисыворотки относительно бацитрацина и Zn-бацитрацина составляет 100 % и < 0,01 % относительно колистина, полимиксина В.

11.4 Диапазон измерений массовой доли бацитрацина составляет от 9,00 до 405,00 мкг/кг.

11.5 Извлечение (открытие) добавки бацитрацина в холостом образце продукта – не менее 75 %.

11.6 Повторяемость (коэффициент вариации) результатов определения массовой доли бацитрацина в контрольных пробах различных видов продуктов в одной постановке ИФА не превышает 15 %.

11.7 Воспроизводимость (коэффициент вариации) результатов определения массовой доли бацитрацина в контрольных пробах различных видов продуктов в нескольких постановках ИФА не превышает 25 %.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1 Тест-систему хранят в упаковке изготовителя при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение всего срока годности, не допуская замораживания.

12.2 Срок годности тест-системы – 12 месяцев от даты изготовления.

13 ОБЗОР ВЕРСИЙ

Номер версии	Описание
-	Первая версия