



ПРОДОСКРИН® Стрептомицин

Набор реагентов для определения стрептомицина в пищевой продукции методом иммуноферментного анализа

Версия 1.0

РАЗРАБОТАНО

Институт биоорганической химии НАН Беларуси

ТУ BY 100185129.148-2015

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® Стрептомицин

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система «ПРОДОСКРИН® Стрептомицин» предназначена для определения остаточных количеств стрептомицина и дигидрострептомицина в пищевых продуктах и продовольственном сырье животного происхождения, включающих молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое восстановленное и сгущенное, молочные сливки и сухие молочные сливки восстановленные, коктейли молочные, мороженое на молочной основе, молочные смеси для детского питания, молочную сыворотку и восстановленную молочную сыворотку, творог и творожные продукты, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта, тан, айран, простокваша т.п.), масло сливочное, сыр, мясо (мышцы), печень, креветки, яблочный сок и мед, методом иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2 Стрептомицин и дигидрострептомицин относятся к аминогликозидам. В ветеринарной медицине стрептомицин и дигидрострептомицин, наряду с пенициллином, используются часто и главным образом для лечения маститов. При нарушении правил использования этих антибиотиков и при несоблюдении предписанного режима применения следовые количества стрептомицина/дигидрострептомицина могут появляться в продуктах питания животного происхождения. В высоких концентрациях стрептомицин обладает ото- и нефротоксическим действием. Постоянное воздействие на организм человека низких концентраций стрептомицина в составе продуктов питания вызывает проявления аллергического характера, подавление микрофлоры кишечника и повышение устойчивости патогенных микроорганизмов. Для обеспечения безопасности животноводческой продукции установлены максимально допустимые уровни стрептомицина/дигидрострептомицина в пищевой продукции и введена система обязательного контроля содержания этих антибиотиков в различных видах продукции.

1.3 Тест-система рассчитана на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых (неизвестных) проб, 6 градуировочных растворов, всего 96 определений в диапазоне концентраций 0,5 – 40,5 мкг/л или мкг/кг. Конструкция тест-системы позволяет осуществить несколько постановок иммуноферментного анализа (ИФА): например, одна постановка – 4 стрипа (32 лунки). Продолжительность анализа составляет около 1 ч без учета пробоподготовки.

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 тест-системы | Количество в комплекте |
|--|---|
| 1 | 2 |
| Микропланшет-иммуносорбент, планшет с иммобилизованными антителами | 1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок |
| Градуировочные растворы (С ₁ –С ₆) с концентрациями стрептомицина в диапазоне (0–40,5) мкг/л (точные значения концентраций указываются в паспорте к тест-системе) | 6 микропробирок или флаконов по 1,3 мл |
| Конъюгат стрептомицина и пероксидазы из корней хрена, готовый к применению | 1 флакон, 6 мл |
| Буфер для разведения исследуемых проб | 1 флакон, 50 мл |
| Моющий буфер, 10-кратный концентрат | 1 флакон, 100 мл |
| Хромоген-субстратный раствор | 1 флакон, 14 мл |
| Стоп-реагент | 1 флакон, 14 мл |

2.2 В лунки планшетного иммуносорбента вносят градуировочные растворы или исследуемые пробы и конъюгат стрептомицина с пероксидазой. Во время инкубации конъюгат стрептомицин-пероксидаза и стрептомицин в составе пробы конкурируют за связывание с поликлональными антителами к стрептомицину, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Чем больше содержится стрептомицина в пробе, тем меньше конъюгата связывается с антителами на твердой фазе. После удаления несвязавшихся реагентов моющим буфером 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 стрептомицина в пробе. По градуировочной кривой рассчитывается концентрация стрептомицина в пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

4.1 Для исключения некорректных результатов исследуемые образцы продуктов необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Пробу каждого образца и 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 анализа все компоненты тест-системы должны быть доведены до комнатной температуры (20-25) °С.

4.4 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость.

4.5 Вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта. 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 для мойки посуды.

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 анализа начато, то все последовательные стадии следует заканчивать, не делая перерывов. Необходимо исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

4.8 Необходимо использовать пипетки полуавтоматические одноканальные 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 анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности. Не следует держать компоненты на ярком свете во время инкубации или при хранении.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

5.1 При работе с тест-системой следует использовать 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 г (пробирки вместимостью 15 мл и 50 мл) и не менее 18000 - 20000 г (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;

- рН-метр с диапазоном измерений от 0 рН до 14 рН и погрешностью $\pm 0,1$ рН 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;

- магнитная мешалка;

- цилиндры мерные вместимостью 25 мл, 50 мл и 250 мл;

- колбы мерные вместимостью 50 мл, 100 мл и 1000 мл;

- стаканы мерные вместимостью 150 мл и 500 мл;

- колбы конические вместимостью 100 мл, 250 мл и 500 мл;

- флакон из пластмассы вместимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой;

- флакон из пластмассы черного цвета вместимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой;

- пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающейся крышкой (типа Фалкон) вместимостью 50 мл и 15 мл;

- пробирки полипропиленовые центрифужные с крышкой (типа Эппендорф) вместимостью 2 мл;

- пробирки мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 10 мл;

- секундомер

- 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;

- штативы для пробирок;

- шпатели пластиковые;

- пипетки Пастера;

- палочки стеклянные оплавленные.

5.2 При работе с тест-системой используются следующие реактивы:

- вода дистиллированная и деионизованная;

- гексан ч. по ТУ 6-09-3375;

- метанол ч.д.а по ГОСТ 6995;

- твин 20 ч.д.а;

- натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233;

- натрия фосфат двуосновной дигидрат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) или натрий фосфорнокислый 2-замещенный, 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ч.д.а. по ГОСТ 4172;
- натрия фосфат одноосновной моногидрат ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) или натрий фосфорнокислый 1-замещенный, 2-водный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ч.д.а. по ГОСТ 4245;
- калия железистосинеродистый 3-водный ч.д.а. по ГОСТ 4207;
- цинк сернокислый 7-водный х.ч. по ГОСТ 4174;
- гептан-сульфоново́вая кислота ;
- натрий фосфорнокислый трехзамещенный двенадцативодный ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$);
- о-фосфорная кислота по ГОСТ 6552-58;
- натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328.

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

5.3 Приготовление растворов

5.3.1 Приготовление реактивов Карреза

Для приготовления реактива Карреза 1 навеску 7,6 г калия железистосинеродистого 3-водного помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в небольшом количестве воды, доводят до 50 мл и перемешивают. Реактив Карреза 2 готовят аналогичным образом путем растворения 15,0 г цинка сернокислого 7-водного в 50 мл дистиллированной воды. Приготовленные растворы можно хранить не более 7 дней в холодильнике.

5.3.2 Приготовление фосфатного буфера с твином

Для приготовления фосфатного буфера с твином взвешивают 0,55 г натрия фосфата одноосновного моногидрата (или 0,62 г натрия фосфорнокислого

1-замещенного, 2-водного), 2,85 г натрия фосфата двуосновного дигидрата (или 5,73 г натрия фосфорнокислого 2-замещенного, 12-водного), 9,0 г хлористого натрия. Навески растворяют в дистиллированной воде, добавляют 1 мл твин 20 и доводят объем раствора до 1 л. Раствор хранят при (2-8) °С не более месяца.

5.3.3 Приготовление экстрагирующего и фосфатного буферов для пробоподготовки меда

Для приготовления экстрагирующего буфера 2 г гептан-сульфоново́й кислоты (натриевой соли) и 1,9 г натрия фосфорнокислого трехзамещенного двенадцативодного $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ растворяют в воде, доводят объем раствора до 200 мл. Уровень pH регулируют до 2,0 с помощью о-фосфорной кислоты.

Для приготовления фосфатного буфера для пробоподготовки меда взвешивают 0,55 г натрия фосфата одноосновного моногидрата (или 0,62 г натрия

фосфорнокислого 1-замещенного, 2-водного), 2,85 г натрия фосфата двуосновного дигидрата (или 5,73 г натрия фосфорнокислого 2-замещенного, 12-водного), 9,0 г хлористого натрия. Навески растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 л. Раствор хранят при (2-8) °С не более месяца.

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 Приготовление проб молока, мороженого, молочных сливок, молочных смесей для детского питания

От образца мороженого предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают. Доводят температуру образца до (20-25) °С, выдерживая при комнатной температуре. Образец сырого, пастеризованного, стерилизованного молока перемешивают путем встряхивания и переворачивания в упаковке. Образец мороженого тщательно перемешивают. Сухое молоко и сухие молочные сливки восстанавливают по п. 6.2.1 и тщательно перемешивают, не допуская вспенивания.

Пробы должны храниться в прохладном месте.

6.2.1 Восстановление сухого молока, сухих молочных сливок, сухих молочных смесей для детского питания.

Готовят навеску 0,9 г сухого обезжиренного молока, или 1,2 г и 1,25 г сухого цельного молока с содержанием жира 20 % и 25 %, соответственно, или 1,0 г сухого цельного молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше, 1,6 г сухих молочных сливок и вносят в пробирку. Приливают небольшими порциями дистиллированную воду, нагретую до температуры (40±2) °С, при постоянном перемешивании на вортексе. После того, как раствор станет комнатной температуры, доводят объем до 10 мл и еще раз перемешивают. До начала

анализа оставляют продукт в восстановленном виде минимум на 15 мин. Пробы молочных смесей для детского питания восстанавливают в соответствии с инструкцией производителя. Далее проводят процедуру обезжиривания проб, за исключением обезжиренного молока.

6.2.2 Получение обезжиренного молока, молочных сливок, молочных смесей для детского питания, мороженого.

Для обезжиривания образцы молока сырого, стерилизованного, пастеризованного или восстановленного сухого, молочных сливок или сухих молочных сливок, молочных смесей для детского питания, мороженого перемешивают, не допуская вспенивания, и отбирают пробы в чистые пробирки для центрифугирования, центрифугируют 10 мин при 3000 g и 10°C. При отсутствии центрифуги с охлаждением необходимо перед центрифугированием выдержать образцы в морозильной камере в течение (10-15) мин. После центрифугирования шпателем снимают и удаляют верхний жировой слой.

6.2.3 Приготовление растворов проб молока, молочных сливок, молочных смесей для детского питания, мороженого для анализа.

Для проведения ИФА разводят пробы обезжиренного молока, молочных сливок, молочных смесей для детского питания, мороженого буфером для разведения в 20 раз (в соотношении 1+19). Для этого в чистую пробирку вносят буфер для разведения и добавляют пробу, например, 475 мкл буфера для разведения и 25 мкл обезжиренной пробы. Содержимое тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 20.

6.3 Приготовление проб мяса, сыра, печени, почек, креветок.

6.3.1 Приготовление пробы нежирного мяса (за исключением мяса кролика).

Образец гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера, далее отбирают навеску массой 5,0 г в пробирку вместимостью 50 мл и вносят 20 мл фосфатного буферного раствора с твином (п. 5.3.2) или моющим буфером. Встряхивают пробирку на шейкере в течение 30 мин и центрифугируют при 4000 g 10 мин при температуре (20-25) °C. Отбирают аликвоту супернатанта и разводят буфером для разведения в 10 раз (в соотношении 1+9), например, 50 мкл супернатанта и 450 мкл буфера. Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 50

6.3.2 Приготовление проб сыра, мяса с высоким содержанием жира (за исключением мяса кролика), печени, почек, креветок.

Образец гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера, далее отбирают навеску массой 5,0 г в пробирку вместимостью 50 мл и вносят 20 мл

рабочего моющего буфера (п. 7.2). Встряхивают пробирку на вортексе 10 сек и на шейкере в течение 30 мин и центрифугируют при 4000 g 10 мин при температуре (20-25) °С. Отбирают 5,0 мл супернатанта в пробирку для центрифугирования, добавляют 3,0 мл н-гексана и перемешивают в течение 5 мин. Центрифугируют пробу при 4000 g 10 мин при температуре (20-25) °С и полностью удаляют верхний слой гексана. Отбирают аликвоту супернатанта и разводят буфером для разведения в 10 раз (в соотношении 1+9), например, 50 мкл супернатанта и 450 мкл буфера. Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 50

6.3.3 Приготовление проб мяса кролика.

При исследовании сложных проб необходимо проводить дополнительное осаждение белков с использованием реактивов Карреза.

Образец гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера, далее отбирают навеску массой 5,0 г в пробирку вместимостью 50 мл и вносят 20 мл фосфатного буферного раствора с твином (п. 5.3.2) или моющего буфера. Встряхивают пробирку на шейкере в течение 30 мин и центрифугируют при 4000 g 10 мин при температуре (20-25) °С. Отбирают аликвоту супернатанта в объеме 4,0 мл в пробирку для центрифугирования и добавляют 0,1 мл реактива Карреза 1 и 0,1 мл реактива Карреза 2, доводят объем раствора в пробирке до 5 мл, добавив 0,8 мл дистиллированной воды. Перемешивают раствор, встряхивая пробирку в течение 10 секунд, и центрифугируют при 4000 g 10 мин при температуре (20-25) °С. Для обезжиривания экстрактов проб печени и мяса кролика далее отбирают 2 мл надосадочной жидкости из пробирки и проводят обезжиривание, как описано в п. 6.3.2, используя 3 мл гексана. Затем отбирают аликвоту супернатанта и разводят буфером для разведения в 8 раз (1+7), например, 100 мкл супернатанта и 700 мкл буфера. Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 50

6.4 Приготовление проб меда

Готовят смесь метанола и дистиллированной воды за 1 ч до подготовки колонок RIDA®C18 и перед использованием с помощью вортекса удаляют появившиеся пузыри.

Готовят навеску 1,0 г меда, вносят в пробирку и доводят объем с помощью экстрагирующего буфера (п. 5.3.3) до 10 мл. Встряхивают на шейкере в течение 10 мин до полного растворения меда, центрифугируют раствор до его осветления при 3000 g 10 мин и комнатной температуре (20-25) °С. Проводят очистку полученного экстракта с помощью хроматографической колонки RIDA □ C18 (Ар-тикул R2002) в соответствии с инструкцией изготовителя.

При использовании колонок RIDA®C18 рекомендуется провести их предварительную подготовку. Перед использованием промывают колонку путем последовательного внесения метанола и дистиллированной воды со скоростью

1 капля в секунду следующим образом: 2 мл метанола (100 %), а затем 2 мл дистиллированной воды.

После подготовки колонки пропускают через нее 5 мл подготовленного раствора исследуемой пробы меда со скоростью 15 капель в мин, далее промывают колонку 3 мл дистиллированной воды, затем удаляют из колонки остатки жидкости и просушивают в потоке воздуха или азота в течение 2 мин. Элюируют пробу с колонки с помощью 1 мл метанола (100 %) со скоростью 15 капель в мин, выпаривают собранный элюат досуха при 60 °С в слабом потоке воздуха или азота и растворяют сухой остаток в 2 мл фосфатного буфера (п. 5.3.3). Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 4.

6.5 Приготовление проб молочной сыворотки, восстановленной молочной сыворотки

Доводят температуру образца до (20-25) °С, выдерживая при комнатной температуре.

Готовят навеску 1,25 г сухой молочной сыворотки и вносят в пробирку. Приливают небольшими порциями дистиллированную воду, нагретую до температуры (40±5) °С, при постоянном перемешивании на вортексе. После того, как раствор станет комнатной температуры, доводят объем до 10 мл и еще раз перемешивают. До начала анализа оставляют продукт в восстановленном виде минимум на 15 мин.

Уровень pH отобранного образца сыворотки доводят до 7,0, добавляя по каплям 30 % раствор гидроокиси натрия. Пробу выдерживают на водяной бане при температуре 50±5 °С в течение 15 мин. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе, после чего центрифугируют 10 мин при 3000 g и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением необходимо перед центрифугированием выдержать образцы в морозильной камере в течение

10-15 мин.

Для проведения ИФА разводят пробы надосадочной жидкости буфером для разведения в 20 раз (в соотношении 1+19). Для этого в чистую пробирку вносят буфер для разведения и добавляют пробу сыворотки, например, 475 мкл буфера для разведения и 25 мкл пробы. Содержимое тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 20.

6.6 Приготовление проб творога, кисломолочных продуктов, молочных коктейлей

Доводят температуру образца до (20-25) °С, выдерживая при комнатной температуре. При наличии в образцах кисломолочных продуктов частиц твердой консистенции их отбрасывают. Образцы творога гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера, другие образцы кисломолочной продукции тщательно перемешивают, далее отбирают навеску массой 5,0 г в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл и выдерживают на водяной бане при температуре 50±5 °С в течение 15 мин. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе, после чего центрифугируют 10 мин при 3000 г и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением необходимо перед центрифугированием выдержать образцы в морозильной камере в течение 10-15 мин.

Для проведения ИФА разводят пробы надосадочной жидкости буфером для разведения в 20 раз (в соотношении 1+19). Для этого в чистую пробирку вносят буфер для разведения и добавляют анализируемую пробу, например, 475 мкл буфера для разведения и 25 мкл пробы. Содержимое тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 20.

6.7 Приготовление проб сгущенного молока

Доводят температуру образца до (20-25) °С, выдерживая при комнатной температуре. Навеску сгущенного молока массой 25,0 г вносят в стакан вместимостью 100 мл. Приливают небольшими порциями дистиллированную воду, нагретую до температуры (30±2) °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. Затем переносят растворенное молоко в мерные колбы на 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой.

Далее пробы сгущенного молока подвергают процедуре обезжиривания. Для приготовления пробы обезжиренного сгущенного молока отбирают молоко в чистые пробирки, центрифугируют 10 мин при 3000 г и 10°С. При отсутствии центрифуги с охлаждением необходимо перед центрифугированием выдержать образцы в морозильной камере в течение 10-15 мин. После центрифугирования шпателем снимают и удаляют верхний жировой слой. Для проб восстановленного обезжиренного сгущенного молока процедуру обезжиривания не производят.

Для проведения ИФА разводят пробы обезжиренного сгущенного молока буфером для разведения в 20 раз (в соотношении 1+19). Для этого в чистую пробирку вносят буфер для разведения и добавляют пробу молока, например, 950 мкл буфера для разведения и 50 мкл молока. Содержимое тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 80.

6.8 Приготовление проб масла

Охлажденный до температуры минус 10 °С образец измельчают с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца до (20-25) °С, выдерживая при комнатной температуре. Отбирают навеску массой 1,0 г в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл и выдерживают на водяной бане при температуре 40±5 °С до полного расплавления масла.

В пробирки с пробами добавляют 1 мл н-гексана и перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Добавляют в пробирки 1 мл раствора метанола (2+8 по объему). Содержимое пробирок перемешивают на вортексе, затем экстрагируют на ротаторе в течение 10 мин. Центрифугируют пробу при 2000 г 10 мин при температуре 4 °С и полностью удаляют верхний слой гексана. Повторно в пробирки добавляют 1 мл н-гексана и перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Повторяют центрифугирование при 2000 г 10 мин при температуре 4°С и полностью удаляют верхний слой гексана.

1,0 мл водного слоя переносят в пробирки для центрифугирования объемом 1,5 или 2 мл. Пробирки помещают на лед и выдерживают в течение 15 мин. Проводят центрифугирование при 20000 г 10 мин при температуре 20-25 °С или при 18000 г 15 мин при температуре 20-25 °С. При отсутствии центрифуги, обеспечивающей режим центрифугирования 20000g, вместо центрифугирования проводят фильтрование пробы через шприц-фильтр.

Отбирают аликвоту водной фазы и разводят буфером для разведения в 17 раз (в соотношении 1+16) например, 50 мкл супернатанта и 800 мкл буфера. Для постановки анализа используют 50 мкл полученного раствора на лунку.

Фактор разведения 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).

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

7.1 Перед проведением ИФА компоненты тест-системы и исследуемые пробы выдерживают при комнатной температуре (20–25) °С 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 – необходимо подогреть на водяной бане или поместить в ультразвуковую баню. Разводят нужный объем раствора в 10 раз (соотношение по объему 1+9) дистиллированной или деионизированной водой. Для этого в мерный стакан (цилиндр) отбирают необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов,

доводят деионизованной водой до нужного объема и перемешивают полученный рабочий раствор. Приготовленный раствор можно хранить при (2-8) °С в течение

1 мес.

7.3 Использование хромоген-субстратного раствора

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, необходимо отмывать без применения синтетических моющих средств. Необходимо использовать только новые наконечники при работе с хромоген-субстратным раствором.

7.4 Подготовка иммуносорбента

Планшетный иммуносорбент освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения контроля 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: С₁ – 2 лунки, С₂ – 2 лунки, С₃ – 2 лунки, С₄ – 2 лунки, С₅ – 2 лунки, С₆ – 2 лунки, Х_і – по 2 лунки (таблица 2).

Таблица 2 – Схема маркировки лунок для ИФА

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----|---|
| A | С ₁ | С ₅ | Х ₃ | Х ₇ | ... | |
| B | С ₁ | С ₅ | Х ₃ | Х ₇ | ... | |
| C | С ₂ | С ₆ | Х ₄ | Х ₈ | | |
| D | С ₂ | С ₆ | Х ₄ | Х ₈ | | |
| E | С ₃ | Х ₁ | Х ₅ | Х ₉ | | |
| F | С ₃ | Х ₁ | Х ₅ | Х ₉ | | |
| G | С ₄ | Х ₂ | Х ₆ | Х ₁₀ | | |
| H | С ₄ | Х ₂ | Х ₆ | Х ₁₀ | | |

Примечание – (С₁–С₆) – лунки для градуировочных растворов, Х_і – лунки для исследуемых проб продуктов.

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

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Отбирают по 50 мкл раствора из каждого флакона с градуировочными растворами С₁-С₆ (в порядке возрастания их концентраций) и из пробирок с исследуемыми пробами продуктов и вносят в лунки в соответствии с маркировкой.

8.2 Во все лунки вносят по 50 мкл раствора конъюгата.

8.3 Перемешивают содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола. Планшет заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре (20-25) °С в течение 30 мин.

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 выполняют промывку в соответствии с прилагаемой программой;
- на всех этапах промывания контролируют заполнение всех лунок и полное удаление жидкости из них;
- не допускают переполнения лунок и перетекания жидкости между ними;
- выдерживают 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 хромоген-субстратного раствора. Аккуратными круговыми движениями перемешивают содержимое лунок. Планшет заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при (20-25) °С в темноте в течение 15 мин.

8.6 Останавливают 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.

8.7 В течение не более 15 мин 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 (V_i) для каждой пары лунок, содержащих градуировочные растворы С1 – С6 и пробы исследуемых образцов продуктов X_i .

Строят градуировочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая по линейной оси ординат значения ОП в о.е. или V_i/V_0 в процентах, а по логарифмической оси абсцисс – значения концентраций стрептомицина, выраженные в мкг/л в соответствующих градуировочных растворах.

По градуировочному графику определяют содержание стрептомицина в исследуемых пробах продуктов (градуировка оси абсцисс 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 оказывает неспецифическое ингибирующее действие на связывание конъюгата стрептомицин-пероксидаза с антителами. Это проявляется в снижении ОП или V_i/V_0 в лунках с пробами исследуемых продуктов, которые заведомо не содержат стрептомицина. Измерение кажущихся концентраций холостых образцов C_x и расчет стандартных отклонений (SD) позволяют найти предел обнаружения $ПО = C_x + 3 SD$ и предел количественного определения $ПКО = C_x + 6SD$.

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

9.2 Расчеты с использованием программного обеспечения

Обработку результатов измерений можно производить с помощью программного обеспечения "RIDA Soft", версии 8.85 BEL и выше, 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 стрептомицина и конъюгата стрептомицин-пероксидаза: V_0 – от 1,3 до 2,7 о.е; V_1/V_0 – от 70 до 95 %, V_5/V_0 – от 5 до 30 %.

10.2 Чувствительность: минимальная концентрация стрептомицина в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью тест-системы ($V_0 - 2 SD$), не превышает 0,5 мкг/л.

10.3 Коэффициент вариации результатов измерений концентрации стрептомицина в пробах в одной постановке анализа не превышает 15 %.

10.4 Специфичность. В тест-системе используются высокоспецифичные антитела к стрептомицину (100 %) и дигидрострептомицину (150 %), которые не дают перекрестной реакции с антибиотиками других классов.

10.5 Извлечение (открытие) добавки стрептомицина в холостом образце продукта составляет не менее 80 %.

10.6 Пределы количественного определения стрептомицина в различных видах сырья и продукции животного происхождения составляют:

- молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное и сухое восстановленное, мороженое, молочные смеси для детского питания, молочная сыворотка, восстановленная молочная сыворотка, коктейли молочные, творог, кисломолочные продукты – 10 мкг/кг;

- сгущенное молоко – 40 мкг/кг;

- масло сливочное – 10 мкг/кг;

- мясо, печень, сыр – 25 мкг/кг;

- мед – 5 мкг/кг.

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 сут. Замораживание тест-системы и отдельных компонентов не допускается.

11.2 Срок годности тест-системы – 12 месяцев.

11.3 Неиспользованные стрипы должны храниться в герметично закрытом полиэтиленовом пакете с осушителем при температуре (2-8) °С в течение 6 мес.

11.4 Конъюгат, градуировочные растворы, концентрат моющего буфера, хромоген-субстратный раствор и стоп-реагент после вскрытия флаконов и последующей укупорки можно хранить при температуре (2-8) °С в течение срока годности тест-системы.

11.5 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.

12 ОБЗОР ВЕРСИЙ

| Номер версии | Описание |
|---------------------|-----------------|
| - | Первая версия |