



МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин М1

Набор реагентов для определения афлатоксина М1 в молочной продукции методом иммуноферментного анализа

Версия 1.0

РАЗРАБОТАНО
ОДО «КомПродСервис»

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



МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин М1

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Набор реагентов МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин М1 предназначен для количественного определения содержания афлатоксина М1 в молоке, сухом молоке и кисломолочных продуктах в целях ветеринарно-санитарной экспертизы и санитарно-гигиенического контроля методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа.

1.2 Наличие микотоксинов в продуктах питания вызывает ряд необратимых патологических изменений в организме, представляя серьезную угрозу для здоровья человека и животных, и приносит большой экономический ущерб в сельском хозяйстве. В Республике Беларусь контроль молока и молочных продуктов на наличие и содержание микотоксина М1 регулируется санитарными нормами и правилами «Требования к продовольственному сырью и пищевым продуктам», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.13г. №52, и гигиеническим нормативом «Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.13г. №52, ТР ТС 021 «О безопасности пищевой продукции».

1.3 Набор рассчитан на проведение анализа 43 исследуемых проб и 5 градуировочных растворов в дубликатах или 91 исследуемой пробы и 5 градуировочных растворов при проведении единичных измерений, всего 96 определений. При необходимости набор может быть разделен на 3-4 независимые части с различным количеством определяемых проб. Для каждой постановки необходимо построение нового градуировочного графика.

Предел измерений афлатоксина М1 определяется нижним значением величины диапазона измерений. Диапазон измерения (0,03 – 2,4 мкг/кг). Продолжительность анализа составляет 75-80 мин 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 набора

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 афлатоксина М1 0; 0,03; 0,09; 0,27, 0,81 и 2,43 мкг/кг, готовы к использованию	6 флаконов по 1 мл
3 Конъюгат, готов к использованию	1 флакон, 7 мл
4 Раствор антител, готов к использованию	1 флакон, 7 мл
5 Промывочный раствор, 20-кратный концентрат	1 флакон, 40 мл
6 Раствор для разбавления образца, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл
7 ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин)	1 флакон, 7 мл
8 Субстратный буферный раствор	1 флакон, 7 мл
9 Стоп-реагент	1 флакон, 7 мл

Примечание

Субстратный буферный раствор и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента - хромоген-субстратного раствора.

2.2 Принцип работы набора. В наборе МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин М1 использован метод не прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее – ИФА). В лунки иммуносорбента вносят раствор антител, раствор пероксидазного конъюгата, добавляют градуировочные растворы с известной концентрацией афлатоксина М1 или подготовленные к анализу растворы проб. Во время последующей инкубации афлатоксин М1 в составе градуировочного раствора или анализируемой пробы конкурируют с антигеном, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок иммуносорбента за связывание с антителами. После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами микотоксины, добавляют хромоген-субстратный раствор, который под действием фермента в составе, связанного с антителами конъюгата, превращается в окрашенный продукт. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации афлатоксина М1 в анализируемом образце или градуировочном

растворе, т.е. чем больше содержится афлатоксина М1, тем меньше антител и конъюгата связывается с твердой фазой. 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, выраженную в оптических единицах (о.е.), при длине волны 450 нм. На основании значений оптической плотности строится градуировочный график и рассчитывается концентрация афлатоксина М1 в исследуемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

3.2 Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с анализируемыми образцами и стандартами для градуировки, так как они содержат афлатоксин М1, обладающий канцерогенным, нефро- и гепатотоксичным действием.

Стоп-реагент содержит 2 М 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 набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

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

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Реагенты набора, пробы, градуировочные и другие растворы, используемые в анализе, необходимо отбирать отдельными наконечниками к пипетке.

4.2 Не допускается использование набора после окончания срока годности.

4.3 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из разных серий данного набора или отдельные компоненты из наборов 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, а также растворов в лунках планшета для смешивания. 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 Поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор перед использованием должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 При работе с набором 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 %.

Восьмиканальный дозатор переменного объема (5-300) мкл с погрешностью дозирования не более 3 % со сменными одноразовыми наконечниками.

Одноканальные дозаторы переменного объема: (5-50) мкл с погрешностью дозирования не более 5 %, (20-200) мкл с погрешностью дозирования не более 2 %, (100-1000) мкл с погрешностью дозирования не более 1,5 % со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

Лабораторный встряхиватель, диапазон регулирования скорости (0-300) об/мин.

Центрифуга лабораторная, со скоростью вращения ротора не менее 4000 об/мин.

Секундомер или таймер.

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры (20-25) °С.

Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру (2-8) °С с морозильной камерой, обеспечивающей температуру не выше минус 18 °С.

Колбы конические стеклянные вместимостью 100 мл.

Стаканы стеклянные вместимостью 100 и 500 мл.

Цилиндры стеклянные вместимостью 50, 100 и 500 мл.

Пробирки центрифужные вместимостью 15 мл.

Флаконы из пластмассы вместимостью (20-40) мл с завинчивающейся крышкой.

Пробирки стеклянные или полипропиленовые вместимостью 5,0 мл.

Стеклянные емкости с плотно закрывающимися крышками.

Пленка «парафильм», клейкая лента или крышка для микротитровального планшета.

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

Штатив для пробирок.

Перчатки резиновые или пластиковые.

Вода дистиллированная или деионизованная.

Примечание – Допускается применение другого оборудования, не уступающего по своим свойствам и качеству приведенным выше.

6 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

6.1 Приготовление рабочего промывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора 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 промывочный раствор готовят в стакане вместимостью 500 мл, разбавляя концентрат промывочного раствора дистиллированной водой в соотношении 1+19.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (2-8) °С – 1 мес.

6.2 Приготовление рабочего раствора для разбавления образцов

Раствор для разбавления образцов готовят в пробирке или флаконе, разбавляя концентрат раствора дистиллированной водой в соотношении 1+9.

Рабочий раствор перемешивают круговыми движениями, не допуская образования пены.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

6.3 Хромоген-субстратный раствор (или ТМБ и субстратный буферный 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, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

7 ОТБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРОБ

7.1 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.

7.2 Приготовление проб молока

Доведите температуру образца, отобранного в соответствии с п. 7,1, до значений от плюс 20 до плюс 25 оС, выдерживая его при температуре окружающей среды. Отберите для анализа 50 мкл образца.

7.3 Приготовление проб сухого молока

Отберите 1,0±0,05 г сухого молока в 50 мл центрифужную пробирку, добавьте 10 мл раствора для разбавления образца, тщательно встряхните в течение 3 мин, центрифугируйте при 4000 об/мин при 20°С в течение 10 мин.

Отберите для анализа 50 мкл супернатанта.

7.4 Приготовление проб кисломолочных продуктов

Отберите 1 мл пробы, разбавьте пробу раствором для разбавления образца в соотношении 1:9 (например, 100 мл йогурта + 900 мл раствора для разбавления образца), перемешайте в течение 30 с.

Отберите для анализа 50 мкл приготовленного раствора.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Перед проведением ИФА компоненты набора, подготовленные реагенты и исследуемые пробы выдерживают при температуре

(20-25) °С в течение 60 мин. Перед использованием жидкие реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием, избегая образования пены.

8.2 Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб в микропланшетах согласно таблице 2, с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и раствора пробы требуется две лунки.

Таблица 2– Схема расположения лунок (при исследовании проб в дубликатах)

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₀	C ₀	П ₃	П ₃								
B	C ₁	C ₁	П ₄	П ₄								
C	C ₂	C ₂	П ₅	П ₅								
D	C ₃	C ₃	П ₆	П ₆								
E	C ₄	C ₄	П ₇	П ₇								
F	C ₅	C ₅	П ₈	П ₈								
G	П ₁	П ₁	П ₉	П ₉								
H	П ₂	П ₂	П ₁₀	П ₁₀								

Примечания

1. C₀-C₅ – градуировочные растворы в лунках A-F стрипов №1 и №2, П₁-П₁₀ – растворы проб в лунках G-H стрипов №1 и №2 и в лунках A-H стрипов №3 и № 4.

2. Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальную пипетку. Не следует использовать более 4 стрипов в одной группе исследований.

8.3 Подготовка иммуносорбента

Планшетный иммуносорбент освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно помещают в фольгированный пакет, герметично заклеивают его клейкой лентой и хранят в холодильнике при температуре (2-8) °С в течение 6 месяцев, но не дольше срока годности набора.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выполняют ИФА согласно описанию, приведенного ниже.

9.1 С помощью дозатора в лунки иммуносорбента вносят по 50 мкл градуировочных растворов в порядке возрастания их концентраций и растворов исследуемых проб, приготовленных в соответствии с п. 7.

Затем в лунки иммуносорбента в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 50 мкл раствора конъюгата и 50 мкл раствора антител.

Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.2 Иммуносорбент заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре (20-25) °С в течение 30 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет.

9.3 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем с помощью восьмиканальной пипетки промывают лунки 4 раза по 250 мкл каждую рабочим промывочным раствором (п.6.1), который предварительно вносят в чистую ванночку в объеме из расчета 8 мл на один стрип.

При промывании планшета необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости; не допуская переполнения лунок и перетекания промывочного раствора между ними. Остатки жидкости удаляют, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

9.5 В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 50 мкл ТМБ и 50 мкл субстратного буферного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

Закрывают планшет изолирующим листком или крышкой и инкубируют в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключая попадание света, при температуре (20-25) °С.

9.6 Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 50 мкл стоп-реагента, предварительно внесенного в чашку Петри или пластмассовую кювету из расчета 0,5 мл на стрип. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 В течение не более 5 мин после остановки реакции измеряют в планшетном спектрофотометре оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм.

10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Для построения градуировочного графика и расчета массовой доли М1 в анализируемых образцах используют прилагаемый шаблон программы в Microsoft Excel, поставляемый к набору, или программное обеспечение стороннего производителя (например, встроенное программное обеспечение микропланшетного фотометра), после внесения необходимых параметров данного ИФА. В расчетную программу введены значения концентраций афлатоксина М1 в градуировочных растворах в терминах массовых концентраций (мкг/кг).

10.2 На основании внесенных оператором в таблицу раздела 1 прилагаемого шаблона измерений оптической плотности для каждого градуировочного

раствора строится градуировочный график зависимости V_i/V_0 , % (ось ординат) от натурального логарифма концентрации C_i (ось абсцисс), где:

V_i – значение оптической плотности для i -го градуировочного раствора, о.е, (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

V_0 – значение оптической плотности для градуировочного раствора C_0 , о.е, (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

C_i – концентрация афлатоксина М1 в градуировочном растворе, выраженная в мкг/кг.

Программа автоматически рассчитывает на основании градуировочного графика массовую концентрацию афлатоксина М1, мкг/кг, в исследуемых пробах после внесения оператором значений оптической плотности V_p , в о.е., в соответствующие графы таблицы раздела 2 прилагаемого шаблона.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение \bar{C}_p результатов измерений двух параллельных проб одного образца, умноженный на коэффициент разведения пробы.

При проведении единичного измерения (одной пробы образца), за окончательный результат принимают полученное значение единичного измерения.

При выполнении анализа в соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

Образец	Коэффициент разведения
Молоко	1
Сухое молоко	10
Кисломолочные продукты	10

Обработка результатов анализа без использования программного обеспечения:

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

Нулевой стандарт приравнивается к 100%, а величины оптической плотности выражаются в процентах. По величинам относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим значениям концентрации афлатоксина М1 в мкг/л строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат.

11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАБОРА

11.2 Чувствительность: минимальная концентрация афлатоксина М1 в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью набора, не превышает 0,03 мкг/кг.

11.3 Специфичность. В наборе МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин М1 при изготовлении иммуносорбента используются высокоспецифичные антитела. Кросс-реактивность набора по отношению к афлатоксину М1 - 100%, афлатоксину В1 - 12.9%, афлатоксину В2 - 1.4%, афлатоксину G1 - 1.9%, афлатоксину G2 - 0.3%.

11.4 Диапазон измерений составляет от 0,03 до 2,43 мкг/кг.

11.5 Извлечение (открытие) добавки афлатоксина М1 в молоке - $90\pm 25\%$, в сухом молоке, йогурте - $100\pm 30\%$.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1 Набор хранят в упаковке изготовителя при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности, не допуская замораживания.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев от даты изготовления.

13 ОБЗОР ВЕРСИЙ

Номер версии	Описание
1.0	Первая версия