ПРОДОСКРИН® ПЕНИЦИЛЛИН

Тест-система для определения антибиотиков группы пенициллинов методом иммуноферментного анализа

Версия 1.0

Изготовлено ОДО «КомПродСервис»
в производственной кооперации с Институтом биоорганической химии НАН Беларуси

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°С

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

Изготовитель:

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. Растопчина, 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

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин предназначена для скрининговых исследований содержания остаточных количеств антибиотиков группы пенициллинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье животного происхождения методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа в микропланшетах.

1.2 Пенициллины являются основой современной химиотерапии в ветеринарной медицине, занимают важное место в лечении большинства инфекционных болезней животных. Для обеспечения биобезопасности пищевой продукции животного происхождения установлены максимальные допустимые уровни остатков антибиотиков группы пенициллинов в такой продукции и приняты правила контроля их содержания. Эти нормы изложены в Решении Коллегии Евразийской экономической комиссии № 28 от 13.02.2018, ветеринарно-санитарных правилах, принятых Постановлением Минсельхозпрода РБ № 69 от 03.11.2010, Технических регламентах Таможенного союза ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 034/2013, Технических регламентах Евразийского экономического союза ТР ЕАЭС 040/2016 и ТР ЕАЭС 051/2021, Регламенте Европейской комиссии 37/2010.

1.3 Тест-система ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин рассчитана на проведение анализа в параллелях 41 анализируемой пробы и 7 градуировочных растворов при использовании всех стрипов одновременно, всего 96 определений. При необходимости тест-система может быть разделена на 3–4 независимые части с различными количествами определяемых проб. Для каждой постановки необходимо построение нового градуировочного графика. Продолжительность анализа составляет 90–100 минут без учета пробоподготовки.

1.4 Диапазон измерений пенициллинов в молоке, сухом молоке, сухих молочных смесях для детского питания составляет от 0,16 до 8,00 мкг/кг; в молочных коктейлях, мороженном на молочной основе, сливках, кисломолочных продуктах, сыре, твороге, творожной массе, масле сливочном, спреде, животном жире, молочной сыворотке, напитках на основе сыворотки – от 2,5 до 160,0 мкг/кг; в молоке сгущенном – от 1,00 до 32,00 мкг/кг; в мясе, рыбе, креветках – от 2,5 до 160,0 мкг/кг.

1.5 Предел количественного определения пенициллинов в молоке, сухом молоке, сухих молочных смесях для детского питания составляет 0,16 мкг/кг; в молочных коктейлях, мороженном на молочной основе, сливках, кисломолочных продуктах, сыре, твороге, творожной массе, масле сливочном, спреде, животном жире, молочной сыворотке, напитках на основе сыворотки – 2,5 мкг/кг; в молоке сгущенном 1,00 мкг/кг; в мясе, рыбе, креветках – 2,5 мкг/кг.

2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2.1 В состав тест-системы входят компоненты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Состав тест-системы

№ п/п	Компонент	Количество
1	2	3
1	Иммуносорбент, микротитровальный планшет	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
2	Конъюгат, 100-кратный концентрат	1 флакон или микро-пробирка, 0,1 мл
1	2	3
3	Раствор для разведения конъюгата	1 флакон, 10,0 мл
4	Лиофилизованный стандарт с концентрацией ампициллина в восстановленном виде 4 нг/мл	3 флакона
5	Буфер для разбавления	1 флакон, 50 мл
6	Моющий буфер, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл
7	Хромоген-субстратный раствор	1 флакон, 14 мл
8	Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл
9	Лиофилизованный спайк-препарат с концентрацией ампициллина в восстановленном виде 1000 нг/мл	1 флакон
Примечание – В состав тест-системы вместо хромоген-субстратного раствора могут быть включены раствор хромогена ТМБ (3,3’,5,5’-тетраметилбензидин), 1 флакон, 0,7 мл, и субстратный буферный раствор, 1 флакон, 14 мл.		

2.2 Принцип работы тест-системы. В тест-системе ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин использован метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее – ИФА). Применяются микропланшеты с иммобилизованными антителами к антибиотикам группы пенициллинов.

В лунки иммуносорбента (микротитровального планшета) вносят градуировочные растворы с известной концентрацией ампициллина или подготовленные к анализу пробы, добавляют рабочий раствор конъюгата пенициллина с пероксидазой из корней хрена. Во время последующей инкубации антибиотики группы пенициллинов в составе градуировочного раствора или анализируемой пробы конкурируют с конъюгатом за связывание со специфическими антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета. 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 пенициллинов 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, выраженную в оптических единицах (о.е.), при длине волны 450 нм. На основании значений оптической плотности строится градуировочный график и рассчитываются концентрации пенициллинов 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 градуировочными растворами, так как они содержат антибиотик ампициллин.

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

Работа с использованием хлористого метилена должна выполняться в вытяжном шкафу.

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 чистыми одноразовыми 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 или одноразовая пластиковая посуда надлежащего качества. 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 свету во время инкубации или хранения.

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с тест-системой следует использовать следующие средства измерений, оборудование, материалы и реактивы.

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 0,01 г.

Водяная баня, обеспечивающая поддержание температуры 37 и 40 °С с точностью ±5 °С.

Гомогенизатор лабораторный или бытовой блендер.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение 2000 g (для центрифужных пробирок вместимостью 15 мл).

Восьмиканальный дозатор с диапазоном объема дозирования от 5 до 300 мкл с погрешностью дозирования не более 3 % со сменными одноразовыми наконечниками.

Одноканальные дозаторы переменного объема с диапазоном дозирования объемов: от 20 до 200 мкл с погрешностью дозирования не более 2,0 %, от 100 до 1000 мкл с погрешностью дозирования не более 1,5 %, от 1 до 5 мл с погрешностью дозирования не более 2,0 % со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

Пипетки стеклянные вместимостью 5 мл.

Секундомер электронный.

Термостат, обеспечивающий температуру от плюс 20 °С до плюс 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 камерой.

Стаканы вместимостью 100 мл, 150 мл и 500 мл.

Колбы мерные вместимостью 100 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 мл или 2 мл.

Цилиндры мерные вместимостью 25 мл, 50 мл, 100 мл, 500 мл.

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

Пленка «парафильм» или скотч.

www.komprod.com

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

Штатив для пробирок.

Бумага фильтровальная.

Флаконы из пластмассы с завинчивающейся крышкой.

Вода дистиллированная или деионизованная.

Дихлорметан, химически чистый.

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

6 ОТБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРОБ

6.1 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 двух 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.

6.2 Подготовка проб

6.2.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Для подготовки проб используют образцы, отобранные в соответствии с п. 6.1. Доводят температуру образцов до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая молоко при температуре окружающей среды. Перед взятием аликвот испытуемые образцы перемешивают путем встряхивания и переворачивания представленной упаковки.

Отбирают дозатором аликвоты молока объемом 250 мкл и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. К пробам в пробирках добавляют отобранные 250 мкл буфера для разбавления и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы пробы перемешивают.

6.2.2 Подготовка проб сухого молока, сухих молочных смесей, в том числе для детского питания

Для подготовки проб используют образцы, отобранные в соответствии с п. 6.1. Доводят температуру образцов до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды, после чего тщательно перемешивают.

В стаканы вместимостью 100 мл или 150 мл помещают навески образцов сухого молока, взвешенные с точностью до 0,1 г. Массы навесок в зависимости от содержания жира составляют:

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;

- 10,0 г сухого молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5–10 мл приливают дистиллированную воду, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образцов. После растворения сухого молока растворы из стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Восстановление сухих молочных смесей, в том числе для детского питания, проводят в соответствии с инструкцией изготовителя.

Отбирают дозатором аликвоты восстановленных образцов молока или молочной смеси объемом 250 мкл и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. К пробам в пробирках добавляют отобранные 250 мкл буфера для разбавления и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

6.2.3 Подготовка проб молочных коктейлей, мороженного на молочной основе, сливок, кисломолочных продуктов (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), сыра, творога, творожной массы, масла сливочного, спреда, животного жира

Для подготовки проб используют образцы, отобранные в соответствии с п. 6.1. Предварительно отделяют от образцов твердые немолочные компоненты и отбрасывают. Отделяют тесто сыра от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава. Образцы сливочного масла, спреда, охлажденные до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки, перемешивают и доводят до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды. Для остальных образцов доводят температуру до значений от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера (жидкие образцы тщательно перемешивают).

От гомогенизированных образцов отбирают навески массой 0,50 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 3,5 мл дистиллированной воды и отмеренные пипеткой 4,0 мл дихлорметана. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вортексе, а затем при переворачивании на ротаторе в течение 15 мин при скорости 60 об/мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 2000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 50 мл, и переносят ее в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 200 мл буфера для разбавления и тщательно перемешивают на вортексе

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в

течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

6.2.4 Подготовка проб молочной сыворотки, сухой молочной сыворотки, напитков на основе сыворотки

Для подготовки проб используют образцы, отобранные в соответствии с п. 6.1. Доводят температуру образцов до значений от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды, после чего тщательно перемешивают.

В стаканы вместимостью 100 мл или 150 мл помещают навески образцов сухой молочной сыворотки массой 12,5 г, взвешенные с точностью до 0,1 г. Затем приливают небольшими порциями по 10–20 мл дистиллированную воду, нагретую до температуры (40±5) °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образцов. После растворения навески растворы из стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

От гомогенизированных образцов молочной сыворотки, восстановленной молочной сыворотки или напитков на основе сыворотки отбирают навески массой 0,50 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 3,5 мл дистиллированной воды и отмеренные пипеткой 4,0 мл дихлорметана. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вортексе, а затем при переворачивании на ротаторе в течение 15 мин при скорости 60 об/мин. Затем центрифугируют в следующем режиме: 2000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 50 мл, и переносят ее в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 200 мл буфера для разбавления и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

6.2.5 Подготовка проб сгущенного молока

Для подготовки проб используют образцы, отобранные в соответствии с п. 6.1. Доводят температуру образцов до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды. Перед взятием навески испытуемые образцы тщательно перемешивают.

В стаканы вместимостью 100 мл или 150 мл помещают навески образцов массой 25,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г.

Затем в стаканы с навесками небольшими порциями по 5–10 мл приливают дистилированную воду, нагретую до температуры (30±5) °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образцов. После растворения навесок растворы из стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл,

доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Отбирают дозатором аликвоты восстановленного сгущенного молока объемом 250 мкл и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. К пробам в пробирках добавляют отобранные 250 мкл буфера для разбавления и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

6.2.6. Подготовка проб мяса, рыбы (лососевые), креветок, печени и почек скота и птицы

Для подготовки проб используют образцы, отобранный в соответствии с п. 6.1. Доводят температуру образцов до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды. Удаляют из образцов несъедобные части, в т.ч. грубые и кальцинированные сухожилия, костную ткань. Из образцов рыбы и креветок удаляют также плавники, чешую, внутренние органы. Используют мышечную ткань рыбы в естественной пропорции с кожей. Подготовленные образцы гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированных образцов отбирают навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл и в каждую пробирку добавляют 4,0 мл дистиллированной воды. Содержимое пробирок тщательно перемешивают с помощью вортекса, а затем при переворачивании на ротаторе в течение 15 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 2000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 50 мл, и переносят ее в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 350 мл буфера для разбавления и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБ С ДОБАВКОЙ АМПИЦИЛЛИНА

7.1 Приготовление растворов спайк-препарата

Флакон с лиофилизованным спайк-препаратом содержит (1000,0 ± 30,0) нг ампициллина. Перед использованием препарат выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 30 мин, затем восстанавливают лиофилизованный продукт путем внесения 1,0 мл дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения. Получают раствор ампициллина с концентрацией **1000,0 нг/мл.**
Для приготовления рабочего раствора спайк-препарата с концентрацией **200,0 нг/мл**

100 мкл восстановленного препарата вносят в чистый флакон, приливают 400 мкл дистиллированной воды и перемешивают.

Восстановленный препарат с концентрацией ампициллина 1000,0 нг/мл делят на аликвоты, которые хранят при температуре не выше минус 18 °С не более одного месяца. Остатки аликвот после использования дальнейшему хранению не подлежат. Растворы спайк-препарата с концентрацией 200,0 нг/мл используются свежеприготовленными и хранению не подлежат.

7.2 Приготовление рабочих проб с добавкой ампициллина заданной концентрации

В качестве образцов для внесения добавки ампициллина должны быть выбраны матрицы, в которых массовая доля пенициллинов ниже предела количественного определения тест-системой ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин (п. 1.5). Добавка приготовленных рабочих растворов спайк-препарата ампициллина вносится в пробирки с навесками образцов непосредственно перед анализом и тщательно перемешивается, после чего выполняется подготовка проб в соответствии с п.6.2.

Массовая доля ампициллина в пробе с добавкой X_{REF} (уровень искусственной контаминации пробы), мкг/кг, рассчитывается по следующей формуле.

$$X_{REF} = \frac{C_{Amp} \cdot V_{Amp}}{m} \quad (1)$$

где C_{Amp} – концентрация ампициллина в растворе спайк-препарата, добавленного к навеске пробы, нг/мл;

V_{Amp} – объем раствора ампициллина, добавленного к навеске пробы, мл;

m – масса навески пробы, г.

Значение массовой доли ампициллина в пробе с добавкой должно находиться в диапазоне измерений тест-системы ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин.

Масса навески, концентрация и объем добавляемого в нее раствора ампициллина, рассчитанное значение массовой доли ампициллина в пробе с добавкой, а также вариант дальнейшей подготовки проб указаны в таблице 2.

Таблица 2 – Схема приготовления проб с добавкой ампициллина

Вид продукции	m, г	C_{Amp}, нг/мл;	V_{Amp}, мл	X_{REF}, мкг/кг	Вариант пробоподготовки
Сырое, стерилизованное и пастеризованное молоко	5,0	200	0,04	1,60	п.6.2.1
Восстановленное сухое молоко, восстановленные сухие молочные смеси, в том числе для детского питания	5,0	200	0,04	1,60	п.6.2.2
Молочные коктейли, мороженное на молочной основе, сливки, кисломолочные продукты, сыр, творог, творожная масса, масло сливочное, спред, животный жир	0,5	200	0,04	16,0	п.6.2.3
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, напитки на основе сыворотки	0,5	200	0,04	16,0	п.6.2.4
Сгущенное молоко	25,0	1000	0,10	4,00	п.6.2.5
Мясо, рыба (лососевые), креветки, печень и почки скота и птицы.	1,0	200	0,08	16,0	п.6.2.6

8 ПОДГОТОВКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

8.1 Предварительная подготовка и правила обращения с тест-системой

Тест-систему извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С от 0,5 до 1 ч, доводят температуру остальных реагентов до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

Перед использованием реагенты необходимо аккуратно перемешать круговыми движениями флаконов.

Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-систем других партий не допускается.

Не допускается использование реагентов, имеющих следующие признаки распада:

- голубая окраска раствора хромоген-субстратной смеси до внесения его в лунки;

8.2 Подготовка микротитровального планшета

Микротитровальный планшет (иммуносорбент) со стрипами, предварительно подготовленный в соответствии с п. 8.1, освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно помещают в фольгированный пакет, герметично заклеивают его липкой лентой и хранят в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 6 месяцев, но не дольше срока годности тест-системы.

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

Не следует использовать более 6 стрипов в одной группе исследований. При необходимости исследовать большее количество проб анализ выполняется в несколько этапов.

Рисунок – Схема расположения проб в лунках микротитровального планшета

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C_0	C_0	$П_2$	$П_2$								
B	C_1	C_1	$П_3$	$П_3$								
C	C_2	C_2	$П_4$	$П_4$								
D	C_3	C_3	$П_5$	$П_5$								
E	C_4	C_4	$П_6$	$П_6$								
F	C_5	C_5	$П_7$	$П_7$								
G	C_6	C_6	$П_8$	$П_8$								
H	$П_1$	$П_1$	$П_9$	$П_9$								

C_0 – C_6 – градуировочные растворы в лунках A-F стрипов №1 и №2, $П_1$ – $П_9$ – растворы подготовленных проб в лунках G-H стрипов №1 и №2 и в лунках A-H стрипов №3 и 4.

8.3 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 плюс 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 9 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 °С до плюс 8 °С – 1 мес.

8.4 Приготовление градуировочных растворов

8.4.1 Приготовление градуировочного раствора C_6

К содержимому флакона с лиофилизованным стандартом ампициллина (с концентрацией 4 нг/мл в восстановленном стандарте) добавляют отмеренные дозатором 2,0 мл буфера для разбавления. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Градуировочный раствор C_6 делят на аликвоты, которые хранят при температуре не выше минус 18 °С не более 2 недель. Остатки аликвот после использования дальнейшему хранению не подлежат.

8.4.2 Приготовление градуировочных растворов C_1-C_5

Градуировочные растворы готовят путем последовательного разбавления градуировочного раствора C_6, приготовленного по п. 8.4.1, следующим образом. В пробирки для центрифугирования вместимостью 1–2 мл вносят аликвоту буфера для разбавления и аликвоту соответствующего градуировочного раствора. Раствор, от которого отбирается аликвота, и объемы аликвот, используемые при приготовления градуировочных растворов, указаны в таблице 3. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Полученные градуировочные растворы ампициллина хранению не подлежат и должны быть использованы в течение дня.

Таблица 3 – Схема приготовления градуировочных растворов

Номер градуировочного раствора	Концентрация градуировочного раствора, нг/мл	Источник аликвоты раствора ампициллина для приготовления градуировочного раствора	Объем аликвоты раствора ампициллина	Объем буфера для разбавления
C_6	4,000	–	–	–
C_5	2,000	C_6	250 мкл	250 мкл
C_4	1,000	C_5	250 мкл	250 мкл
C_3	0,500	C_4	250 мкл	250 мкл
C_2	0,250	C_3	250 мкл	250 мкл
C_1	0,125	C_2	250 мкл	250 мкл

8.5 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочий раствор конъюгата готовят в пробирке или флаконе, разбавляя концентрат конъюгата пенициллина с пероксидазой раствором для разведения конъюгата в соотношении 1 к 99.

Объем рабочего раствора конъюгата должен быть приготовлен из расчета 50 мкл рабочего раствора конъюгата на каждую лунку. Например, 0,010 мл концентрата конъюгата добавляют к 0,990 мл раствора для разведения конъюгата. Такого количества достаточно для внесения в 2 стрипа, т.е. 16 лунок. Концентрат конъюгата сразу же убирают в холодильник и хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

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

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

8.6 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. При работе с хромоген-субстратной смесью используют только новые наконечники.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1 В лунки иммуносорбента (микротитровального планшета) в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 50 мкл градуировочных растворов C_0–C_6, приготовленных в соответствии с п. 8.4, в порядке возрастания их концентраций и растворов исследуемых проб, приготовленных в соответствии с п. 6.2. Затем в каждую лунку планшета с помощью дозатора вносят по 50 мкл рабочего раствора конъюгата, приготовленного в соответствии с п. 8.5.

9.2 Микротитровальный планшет заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 60 мин, исключая попадание прямого яркого света на планшет.

9.3 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 300 мкл моющего буфера, приготовленного по п. 8.3, и затем выливая его резким переворачиванием планшета. Моющий буфер предварительно вносят в чистую ванночку в объеме из расчета 8,0 мл на один стрип.

При промывании планшета необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости, не допуская переполнения лунок и перетекания воды между ними. После последнего промывания лунок остатки жидкости удаляют, постукивая перевернутым планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

9.4 В каждую лунку промытого планшета с помощью дозатора вносят по 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрывают планшет изолирующим листком или крышкой и инкубируют в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

9.5 Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.6 В течение не более 15 минут измеряют оптическую плотность в каждой лунке планшета с помощью планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм.

10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Для построения градуировочного графика и расчета концентрации пенициллинов в анализируемых образцах используют прилагаемый к тест-системе протокол обработки результатов, представляющий собой файл программы Microsoft Excel или программное обеспечение стороннего производителя (например, встроенное программное обеспечение микропланшетного фотометра), после внесения необходимых параметров данного ИФА.

10.2 В протокол в соответствующие графы вносят полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов C_0–C_6 и растворов проб.

По математическим формулам протокола программа Excel строит градуировочный график зависимости $logit\left(\frac{B}{B_0}\right) = \log\left(\frac{\frac{B}{B_0}}{1-\frac{B}{B_0}}\right)$ от десяточного логарифма концентрации вида

$$logit\left(\frac{B}{B_0}\right) = a + b \cdot lgC, \qquad (2)$$

где B_0 – значение оптической плотности для градуировочного раствора C_0, о.е.;

B – значение оптической плотности, измеренное в лунке с раствором ампициллина, о.е.;

C – концентрация ампициллина в растворе, нг/мл.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a и b производится программным обеспечением с помощью МНК на основании пар значений $logit\left(\frac{B_i}{B_0}\right)$ и lgC_i, полученных для шести градуировочных растворов, где (i = 1..6), C_i – концентрация i-го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности для i-го градуировочного раствора, рассчитанное по двум значениям двух измерений оптической плотности.

Массовая концентрация антибиотиков группы пенициллинов в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = F \cdot 10^{\frac{\mathrm{logit}\left(\frac{B_x}{B_0}\right)-a}{b}}, \qquad (3)$$

где X – концентрация антибиотиков группы пенициллинов в пробе мкг/кг;

B_x – оптическая плотность для раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, приведенный в таблице 4.

Таблица 4 – Значения фактора разбавления

Виды продукции	Значение фактора разбавления
Сырое, стерилизованное и пастеризованное молоко Восстановленное сухое молоко, восстановленные сухие молочные смеси, в том числе для детского питания	2
Молочные коктейли, мороженное на молочной основе, сливки, кисломолочные продукты, сыр, творог, творожная масса, масло сливочное, спред, животный жир. Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, напитки на основе сыворотки	40
Сгущенное молоко	8
Мясо, рыба (лососевые), креветки, печень и почки скота и птицы.	40

Примечания

1. Количество в пробе антибиотиков группы пенициллинов выражается как эквивалент ампициллина.

2. Пробы со значением концентрации ниже предела количественного определения (п. 1.5) следует рассматривать как отрицательные в отношении антибиотиков группы пенициллинов. Выявленные при ИФА положительные пробы (со значением концентраций выше предела количественного определения) подлежат проверке инструментальными методами.

11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

11.1 Параметры ИФА для градуировочных растворов – связывание конъюгата пенициллина с пероксидазой: B_0 – от 1,3 до 2,8 о.е; B_1/B_0 – не более 96 %, B_6/B_0 – не более 30 %.

11.2 Чувствительность: минимальная концентрация ампициллина в градуирочных растворах, достоверно определяемая с помощью тест-системы (B_0 – 2SD), не превышает 0,06 нг/мл.

11.3 Специфичность. В тест-системе ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин при изготовлении иммуносорбента используются поликлональные антитела к пенициллинам. Групповая специфичность антител в терминах кросс-реактивности приведена в таблице 5.

Таблица 5 – Специфичность тест-системы

Вещество	Кросс-реактивность, %
Амоксициллин	110
Ампициллин (вещество стандарта)	100
Бензилпенициллин (пенициллин G)	90
Пиперациллин	60
Оксациллин	54
Клоксациллин	47
Нафциллин	29
Диклоксациллин	18
Цефалосоприны	Менее 0,01

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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**
1.0	Первая версия

Таблица А – Схема анализа

Приготовление градуировочных растворов C_1-C_6		Восстановить стандарт ампициллина 2 мл буфера для разбавления. Провести последовательное разведение раствора ампициллина C_6 буфером для разбавления
Разбавление концентрата конъюгата и концентрата промывочного раствора		Разбавить необходимое количество концентрата конъюгата и концентрата промывочного раствора раствором для разведения конъюгата и дистиллированной водой
Подготовка микротитровального планшета		Вставить в рамку необходимое количество стрипов с иммобилизованными антителами
Иммуносорбент		
Внесение градуировочных растворов и растворов анализируемых проб		Добавить по 50 мкл градуировочного раствора или подготовленного раствора пробы в соответствующую лунку
Внесение рабочего раствора конъюгата		Добавить по 50 мкл конъюгата в каждую лунку
Инкубация		Выдержать при температуре **(2-8) °С** в темноте в течение **60 минут**
Промывание		Промыть три раз моющим буфером порциями по 300 мкл на каждую лунку
Внесение хромоген-субстратного раствора		Добавить по 100 мкл в каждую лунку и выдержать **15 минут** в темноте при температуре (20-25) °С
Внесение стоп-реагента		Добавить по 100 мкл в каждую лунку
Измерение оптической плотности		Измерить на микропланшетном фотометре, длина волны 450 нм

Таблица Б – Возможные проблемы анализа и пути их решения

Проблема	Причина	Решение
1. Высокий фон (ОП пробы C_6 больше 0,60)	Неудовлетворительная промывка	Обязательно выполняйте указанное в инструкции число промывок (п. 9.3). Для приготовления моющего буфера используйте дистиллированную или деионизованную воду надлежащего качества. В случае загрязнения моющего буфера приготовьте свежий раствор. При использовании промывочной машины, убедитесь в правильной ее работе.
	Избыток конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные при разведении 100-кратного концентрата конъюгата (п. 8.4). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	Увеличение продолжительности инкубации сверх указанного в инструкции времени; повышенная температура	Соблюдайте указанные в инструкции продолжительности стадий анализа. Выполняйте первую стадию анализа в течение 60 мин при температуре (2 -8) °С (п. 9.2), вторую – в течение 15 мин при температуре (20 - 25) °С (п. 9.4)
2. Показания низкой абсорбции (оптическая плотность калибровочной пробы C_0 ниже 1,0)	Недостаточно конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные при разведении 100-кратного концентрата конъюгата (п. 8.4). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	В лунки иммуносорбента внесены неправильные объемы реагентов	Вносите в лунки реагенты в объемах, указанных в п. 9. Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	Срок годности реагентов истек, неправильной хранение тест-системы	Обеспечьте правильное хранение тест-системы и не используйте ее после истечения срока годности (п. 12).
	Недостаточная продолжительность стадии анализа, не соблюдены температурные условия проведения анализа	Соблюдайте время инкубации, указанное в инструкции. Выдерживайте компоненты тест-системы при температуре (20 - 25) °С не менее 30 минут перед проведением анализа. Выполняйте первую стадию анализа в течение 60 мин при температуре (2 -8) °С (п. 9.2), вторую– в течение 15 мин при температуре (20 - 25) °С (п. 9.4)

	Концентрат моющего буфера не разбавлен	Убедитесь, что 10-кратный концентрат моющего буфера разбавлен дистиллированной водой в 10 раз перед использованием. Для приготовления моющего буфера используйте дистиллированную или деионизованную воду надлежащего качества
	Стоп-раствор не добавлен	Добавьте стоп-реагент, чтобы получить желтую окраску продукта реакции, которую можно измерить при 450 нм (растворы в лунках должны сменить цвет с голубого на желтый)
3. Значения ОП выше предела микропланшетного фотометра (ОП > 3,0)	Избыток конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные при разведении 100-кратного концентрата конъюгата (п. 8.4). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	Избыточная продолжительность стадий анализа, повышенная температура	Соблюдайте время инкубации, указанное в инструкции. Выдерживайте компоненты тест-системы при температуре (20 - 25) °С не менее 30 минут перед проведением анализа. Выполняйте первую стадию анализа в течение 60 мин при температуре (2 -8) °С (п. 9.2), вторую– в течение 15 мин при температуре (20 - 25) °С (п. 9.4). Сократите время проведения ферментативной реакции более ранним внесением стоп-реагента
	Неудовлетворительная промывка	Обязательно выполняйте указанное в инструкции число промывок (п. 9.3). Для приготовления моющего буфера используйте дистиллированную или деионизованную воду надлежащего качества. В случае загрязнения моющего буфера приготовьте свежий раствор. При использовании промывочной машины, убедитесь в правильной ее работе.
	Голубая окраска хромоген-субстратного раствора до его внесения в лунки	Заменить хромоген-субстратный раствор аналогичным раствором этой же партии. При раскапывании раствора конъюгата и хромоген-субстратного многоканальной полуавтоматической пипетки необходимо использовать два разных лотка для каждого из реагнетов.

4. Высокий разброс значений ОП в парах лунок (коэффициент вариации (КВ) > 15 %)	Хромоген-субстратный раствор и стоп-реагент добавляются не одним и тем же образом	Добавляйте хромоген-субстратный раствор и стоп-реагент в лунки в одном и том же порядке и с одинаковыми скоростями, используя многоканальный дозатор
	Неточность пипетирования	Убедитесь, что дозаторы работают правильно и откалиброваны; при работе с дозатором руководствуйтесь инструкцией по его использованию
	Недостаточное перемешивание раствора конъюгата	Тщательно перемешайте раствор, полученный в результате разведения 100-кратного концентрата конъюгата раствором для разведения конъюгата (п. 8.4)
	Нижняя наружная поверхность микропланшета загрязнена	Перед внесением в лунки хромоген-субстратного раствора переверните планшет кверху дном и убедитесь в отсутствии капель, царапин, отпечатков пальцев и других загрязнений на дне лунок (внешняя поверхность). В случае обнаружения загрязнений аккуратно удалите их мягкой нетканой салфеткой.
5. Вид градуировочного графика не соответствует указанному в паспорте к тест-системе	Неточность пипетирования	Убедитесь, что дозаторы работают правильно и откалиброваны; при работе с дозатором руководствуйтесь инструкцией по его использованию
	Неудовлетворительная промывка	Обязательно выполняйте указанное в инструкции число промывок (п. 9.3). Для приготовления моющего буфера используйте дистиллированную или деионизованную воду надлежащего качества. В случае загрязнения моющего буфера приготовьте свежий раствор. При использовании промывочной машины, убедитесь в правильной ее работе.
	Градуировочные растворы внесены в неправильном порядке	Учтите порядок внесения градуировочных растворов при построении градуировочного графика. При необходимости выполните анализ еще раз соблюдая порядок внесения растворов
	Градуировочные растворы были загрязнены или неправильно приготовлены	Приготовьте новые градуировочные растворы в соответствии с п. 8.6. Вносите стандарты в лунки иммунособента в порядке возрастания их концентраций

www.komprod.com