

ПРОДОСКРИН® ИФА-Тетрациклин

Тест-система для определения антибиотиков
группы тетрациклинов
методом иммуноферментного анализа

Версия 2.1

ТУ ВУ 100185129.149-2015

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 официальному дистрибьютору на территории Вашей страны:

Техническая поддержка

ОДО «КомПродСервис»

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

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



ПРОДОСКРИН® ИФА-Тетрациклин

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система ПРОДОСКРИН® ИФА-Тетрациклин предназначена для скрининговых исследований содержания остаточных количеств антибиотиков группы тетрациклинов (тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина, суммы исходных веществ и их 4-эпимеров) в пищевых продуктах и продовольственном сырье животного происхождения, включающих молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, топленое), молоко сухое восстановленное, коктейли молочные, мороженое на молочной основе, молочные смеси для детского питания, молочную сыворотку и восстановленную молочную сыворотку, пахту, мед, мясо, рыбу, продукты из рыбы, готовые мясные продукты, жиры животные, шпик, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, сыр, масло сливочное, сгущенное молоко, яйцо и яичный порошок, творог, творожные продукты, йогурт, сметану, кефир, простоквашу, ряженку и другие кисломолочные продукты, методом иммуноферментного анализа (ИФА).

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

1.3 Тест-система рассчитана на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых (неизвестных) проб и 6 градуировочных растворов, всего 96 определений в диапазоне концентраций тетрациклина в градуировочных растворах 0,05–1,8 мкг/л. Конструкция тест-системы позволяет осуществить несколько постановок ИФА: например, одна постановка – 4 стрипа (32 лунки). Продолжительность анализа составляет 90–100 мин без учета пробоподготовки.

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	Микропланшет-иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
2	Стандарт тетрациклина, 1,8 мкг/л в восстановленном препарате	3 флакона
3	Конъюгат	1 флакон
4	Раствор для разведения конъюгата	1 флакон, 10 мл
5	Буфер 1	1 флакон, 60 мл
6	Буфер 2	1 флакон, 60 мл
7	Мюющий буфер, 10-кратный концентрат	1 флакон, 100 мл
8	Хромоген-субстратный раствор	1 флакон, 14 мл
9	Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл

Примечания:

1. 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. В состав тест-системы может быть включен лиофилизированный спайк-препарат тетрациклина, 1 флакон. В инструкции по применению препарата указываются концентрация тетрациклина после растворения, а также способ приготовления проб для выполнения теста на открытие внесенной добавки.

2.2 Принцип работы тест-системы. В тест-системе ПРОДОСКРИН® ИФА-Тетрациклин использован метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее – ИФА). Применяются микропланшеты с иммобилизованным антителом к антибиотикам группы тетрациклинов.

В лунки микротитровального планшета вносят градуировочные растворы с известной концентрацией тетрациклина или подготовленные к анализу пробы исследуемых образцов, добавляют раствор конъюгата тетрациклина с пероксидазой из корней хрена. Во время последующей инкубации тетрациклин в составе градуировочного раствора или антибиотика группы тетрациклинов, присутствующие в анализируемой пробе, конкурируют с конъюгатом за связывание со специфическим антителом, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок планшета. После промывки в лунки добавляют хромоген-субстратный раствор, который под действием фермента в составе связанного с антителом конъюгата превращается в окрашенный продукт. Затем добавляют стоп-реагент,

останавливающий ферментативную реакцию и одновременно изменяющий окраску раствора с голубой на желтую. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на многоканальном планшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. Величина оптической плотности (ОП) раствора в лунке обратно пропорциональна концентрации тетрациклинов в пробе. На основании значений оптической плотности строится градуировочный график и рассчитываются массовая доля тетрациклинов 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 тетрациклин.

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 органических растворителей (гексана, метанола) должна выполняться в вытяжном шкафу.

3.3 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 При работе с метанолом и его растворами следует строго соблюдать требования инструкции по технике безопасности при работе с метанолом, утвержденной в установленном порядке в организации.

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

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

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

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

4.1 При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха не более 80 %.

4.2 Реагенты тест-системы, пробы каждого образца и другие растворы, используемые в анализе, необходимо отбирать отдельными наконечниками к дозаторам.

4.3 Не допускается использование тест-системы после окончания срока годности, а также смешивание компонентов тест-систем разных серий и различных производителей.

4.4 Перед постановкой ИФА все компоненты тест-системы должны быть доведены до температуры окружающей среды.

4.5 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость.

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

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

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

4.9 Необходимо использовать дозаторы полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %), а также лабораторные весы и прибор для измерения оптической плотности (планшетный спектрофотометр), поверенные государственной метрологической службой.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

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

Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,01 г.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры в пределах (37–55) °С с точностью ± 5 °С.

Гомогенизатор тканей лабораторный или бытовой блендер.

Центрифуга лабораторная с охлаждением до 4 °С, обеспечивающая относительное центробежное ускорение 4000 g (для центрифужных пробирок вместимостью 15 мл и 50 мл).

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение 20 000 g (для центрифужных пробирок вместимостью 2 мл).

Вортекс лабораторный, обеспечивающий частоту вращения до 1800 об/мин.

Лабораторный ротатор, обеспечивающий частоту вращения до 60 об/мин.

Восьмиканальный дозатор с диапазоном объема дозирования от 50 до 300 мкл с погрешностью дозирования не более 4,6 % со сменными одноразовыми наконечниками.

Одноканальные дозаторы переменного объема с диапазоном дозирования объемов: от 20 до 200 мкл с погрешностью дозирования не более 3,0 %, от 100 до 1000 мкл с погрешностью дозирования не более 1,5 %, от 1 до 10 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 20 °С до 25 °С.

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

Лабораторный рН-метр с диапазоном измерений рН от 0 до 12 и пределами погрешности измерений рН не более $\pm 0,1$ в комплекте с электродом.

Стаканы вместимостью 100 мл, 150 мл и 500 мл.

Колбы мерные вместимостью 100 мл.

Колбы конические вместимостью 100 мл, 250 мл и 500 мл.

Палочки стеклянные оплавленные.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 мл и 50 мл с крышкой.

Пробирки стеклянные вместимостью 5 или 10 мл.

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.

Изолирующая пленка для заклеивания планшетов или крышка для микротитровальных планшетов.

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

Штативы для пробирок.

Пипетки Пастера.

Шпатели пластиковые.

Бумага фильтровальная.

Перчатки хирургические резиновые или пластиковые.

Флаконы из пластмассы с завинчивающейся крышкой.

Допускается применение другого оборудования и материалов, не уступающих по своим свойствам приведенным выше.

5.2 При работе с тест-системой используются следующие реактивы:

- вода дистиллированная и деионизованная;

- натрия гидроксид х.ч. по ГОСТ 4328;

- натрия фосфат двухосновной 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 245;

- натрия хлорид ч.д.а. по ГОСТ 4233;

- кислота соляная х.ч. по ГОСТ 3118.

- гексан ч. по ТУ 6-09-3375;

- метанол ч.д.а по ГОСТ 6995;

- кислота лимонная моногидрат ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) или безводная ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) ч. по ГОСТ 3652;

Допускается применение других реактивов, не уступающих по своему качеству приведенным выше.

5.3 Приготовление растворов

5.3.1 Приготовление 30 % раствора гидроксида натрия

Навеску гидроксида натрия массой 15,0 г помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, приливают отмеренные цилиндром 35 мл дистиллированной воды. После растворения гидроксида 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.

5.3.2 Приготовление 20 мМ фосфатного буфера

Навески натрия фосфата одноосновного моногидрата массой 0,55 г (или натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного массой 0,62 г), натрия фосфата двухосновного дигидрата массой 2,85 г (или натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного массой 5,73 г), натрия хлорида массой 9,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, помещают в

стакан вместимостью 1 л. В стакан приливают 0,8 л дистиллированной воды, перемешивают содержимое до полного растворения и доводят рН раствора до 7,4, добавляя по каплям 30 % раствор гидроокиси натрия, приготовленный по п. 5.3.1, или соляной кислоты. Значение рН раствора проверяют с помощью рН-метра, после чего доводят объем раствора до 1 л и перемешивают.

5.3.3 Приготовление смеси метанола с цитратом натрия (1:9 по объему)

Навеску 21,0 г кислоты лимонной моногидрата (или 19,2 г кислоты лимонной безводной), взвешенную с точностью до 0,1 г, растворяют в 0,8 л дистиллированной воды. Значение рН раствора доводят до 7,0 30 % раствором гидроокиси натрия, приготовленным по п. 5.3.1, или соляной кислотой. Затем объем раствора доводят до 1 л дистиллированной водой. Получают в результате 0,1 М раствор цитрата натрия. Хранят раствор при температуре (2–8) °С не более одного месяца.

Перед использованием к отмеренному объему 0,1 М раствора цитрата натрия добавляют в 9 раз меньший объем метанола и перемешивают. Например, к 225 мл 0,1 М раствора цитрата натрия с рН 7,0, отмеренным цилиндром, приливают отмеренные цилиндром 25 мл метанола. Раствор готовят перед использованием и хранению не подлежит.

5.3.4 Приготовление раствора метанола (1:4 по объему)

В коническую колбу вместимостью 500 мл приливают 200 мл дистиллированной воды, отмеренные цилиндром, затем приливают отмеренные цилиндром 50 мл метанола и перемешивают. Хранят раствор при температуре (20–25) °С в плотно закрытой посуде из темного стекла не более одного месяца в соответствии с установленными в организации правилами хранения метанола и его растворов.

5.3.5 Приготовление смеси буфера Макилвейна с метанолом (1:1 по объему)

Для приготовления буфера Макилвейна в стакан вносят навеску 17,8 г, натрия фосфата двухосновного дигидрата (или натрия фосфорнокислого двухзамещенного 12-водного массой 35,8 г), взвешенную с точностью до 0,1 г, и навеску 10,5 г кислоты лимонной моногидрата (или 9,6 г кислоты лимонной безводной), взвешенную с точностью до 0,1 г. Содержимое стакана растворяют в 0,8 л дистиллированной воды, проверяют рН, при необходимости доводят рН до значения 7,0 с помощью соляной кислоты или 30 % раствора гидроокиси натрия, приготовленного по п. 5.3.1. Дистиллированной водой доводят объем раствора до 1 л и перемешивают. Буфер Макилвейна хранят при температуре (2–8) °С не более одного месяца.

Для приготовления смеси буфера Макилвейна с метанолом (1:1 по объему) перед использованием к отмеренному объему буфера Макилвейна добавляют равный объем метанола и перемешивают.

6 ОТБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРОБ

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 (до температуры не выше минус 18 °С) не более одного раза и хранение в замороженном виде в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб, замороженные образцы должны быть разморожены при температуре (2–8) °С.

6.2 Подготовка проб

6.2.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного, пастеризованного, топленого, восстановленного сухого молока, восстановленной сухой молочной смеси для детского питания, молочных коктейлей, мороженого

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

Для приготовления проб молока сырого, стерилизованного, пастеризованного, топленого, коктейлей молочных, мороженого отобранный образец тщательно перемешивают, не допуская вспенивания. От образца мороженого предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают.

Образец сухого молока после тщательного перемешивания восстанавливают в соответствии с ГОСТ 29245. Для этого навеску сухого молока массой 12,0 г, 12,5 г и 10,0 г (сухое молоко с содержанием жира 20 %, 25 % и иное, соответственно), 9,0 г (сухое обезжиренное молоко), взвешенную с точностью до 0,1 г, помещают в стакан вместимостью 100 мл или 150 мл. Затем в стакан с навеской порциями по 5–10 мл приливают нагретую до температуры 40 °С дистиллированную воду, постоянно перемешивая содержимое стеклянной палочкой. После растворения сухого молока раствор из стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, выдерживают в течение 15 мин, доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Образец сухой молочной смеси для детского питания восстанавливают по приведенной выше схеме, используя отношение массы смеси к объему воды, указанное в инструкции производителя.

От образца сырого, стерилизованного, пастеризованного, топленого, восстановленного сухого молока, восстановленной сухой молочной смеси для детского питания, молочных коктейлей, мороженого отбирают две параллельные пробы объемом 10 мл и помещают в чистые центрифужные пробирки вместимостью 15 мл. Центрифугируют 10 мин при 3000 г и 10 °С.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки с пробами перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение (10–15) мин, охлаждая содержимое пробирки до температуры (2–4) °С.

Шпателем удаляют верхний жировой слой. Чистым наконечником отбирают по 1 мл обезжиренных проб и переносят их в чистые пробирки. Для обезжиренного молока процедуру по удалению жира не производят.

Доводят температуру обезжиренных проб до температуры окружающей среды. В отдельные чистые пробирки вносят по 450 мкл буфера 2, входящего в состав тест-системы, и прибавляют по 50 мкл проб. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 10.

6.2.2 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, пахты

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

В стакан вместимостью 100 мл или 150 мл помещают навеску образца сухой молочной сыворотки массой 12,5 г, взвешенную с точностью до 0,1 г. Затем в стакан с навеской порциями по 10–20 мл приливают нагретую до температуры 40 °С дистиллированную воду, постоянно перемешивая содержимое стеклянной палочкой. После растворения сухой молочной сыворотки раствор из стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, выдерживают в течение 15 мин, доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

В стаканы вместимостью 150 мл наливают по (70–90) мл проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки или пахты и доводят рН раствора до 7,0, добавляя по каплям 30 % раствор гидроокиси натрия, приготовленный по п. 5.3.1.

В отдельные пробирки вносят по 950 мкл буфера 2, входящего в состав тест-системы, и прибавляют по 50 мкл проб молочной сыворотки, восстановленной сухой сыворотки или пахты с доведенным значением рН. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 20.

6.2.3 Подготовка проб меда

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

От образца меда отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки с завинчивающимися крышками вместимостью (50–100) мл. В каждую пробирку вносят по 49 мл 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 5.3.2. Содержимое пробирок растворяют путем интенсивного встряхивания, после чего дополнительно перемешивают на вортексе в течение 2 мин. Полученные растворы используют для анализа. Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают путем переворачивания пробирок несколько раз. Фактор разведения 50.

6.2.4 Подготовка проб мяса, рыбы, продуктов из рыбы

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

Исследуемые образцы мышечной ткани млекопитающих, рыбы или птицы в случае необходимости освобождают от жира и соединительной ткани. Образец гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в центрифужные пробирки вместимостью 15 мл, добавляют в каждую пробирку по 9 мл 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 5.3.2. Перемешивают содержимое пробирок, после чего интенсивно встряхивают вручную или с помощью ротатора при скорости 60 об/мин в течение 10 мин. Центрифугируют пробирки в течение 10 мин при 4000 g и температуре (20–25) °С. При анализе проб с высоким содержанием жира проводят их обезжиривание гексаном. Для этого переносят 1 мл надосадочной жидкости в чистую центрифужную пробирку вместимостью 15 мл и добавляют 2 мл гексана, пробы перемешивают на вортексе в течение 10 с. Затем центрифугируют пробирки 10 мин при 4000 g и температуре (20–25) °С. Верхний слой (гексан) и слой жира между гексаном и водным раствором отбрасывают, а раствор используют для анализа. Фактор разведения 10.

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

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

С готовых к употреблению мясных продуктов удаляют оболочку и поверхностный слой. Образец гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 3,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают в стаканы вместимостью 150 мл или в контейнеры, входящие в комплект миксера. К навескам добавляют по 30 мл 20 мМ фосфатного буфера приготовленного по п. 5.3.2. Стаканы с пробами жиров животных, шпика нагревают до температуры (40 ± 5) °С при помешивании. Смесь гомогенизируют с помощью лабораторного миксера/гомогенизатора, не допуская ее разбрызгивания. Переносят гомогенизированную смесь в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 мл и центрифугируют 10 мин при 4000 g и температуре 10 °С.

При анализе проб с высоким содержанием жира проводят их обезжиривание гексаном. Для этого переносят 1 мл надосадочной жидкости проб в новые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл. В пробирки добавляют отобранные дозатором 2 мл гексана и перемешивают их содержимое на вортексе в течение 10 с. Центрифугируют пробирки при

температуре (20–25) °С, 4000 г, в течение 10 мин. Осторожно удаляют верхний гексановый слой с помощью пипетки Пастера или дозатором.

В отдельные пробирки вносят по 200 мкл буфера 1, входящего в состав тест-системы, и прибавляют по 200 мкл надосадочной жидкости. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 20.

6.2.6 Подготовка проб сыра

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

Отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают.

От измельченного образца сыра отбирают две параллельные навески массой 15,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г, помещают их в стаканы вместимостью 150 мл или в контейнеры, входящие в комплект миксера. К навескам добавляют по 30 мл смеси метанола с раствором цитрата натрия (1:9 по объему), приготовленного по п. 5.3.3, и гомогенизируют с использованием лабораторного миксера, не допуская разбрызгивания смеси. Переносят гомогенизированную смесь в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 мл и выдерживают на водяной бане при температуре (40–45) °С в течение 10 мин. За это время смесь перемешивают 3 раза, энергично встряхивая содержимое.

Проводят центрифугирование проб в течение 15 мин при 3000 г и 4 °С.

Переносят 1 мл среднего водного слоя в пробирку для центрифугирования вместимостью 2 мл и центрифугируют при 20 000 г и температуре (20–25) °С в течение 5 мин.

При отсутствии центрифуги, обеспечивающей режим центрифугирования 20 000 г, удаляют верхний слой жира пластиковым шпателем, после чего фильтруют оставшийся водный слой через складчатый фильтр.

В отдельные пробирки вносят по 450 мкл буфера 1, входящего в состав тест-системы, и прибавляют по 50 мкл надосадочного слоя или фильтрата проб сыра. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 24.

6.2.7 Подготовка проб масла

Образец масла охлаждают до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при комнатной температуре.

От образца масла отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают их в центрифужные пробирки вместимостью 15 мл. Добавляют в пробирки по 1 мл раствора метанола (1:4 по объему), приготовленного по п. 5.3.4, и выдерживают пробирки на водяной бане при температуре (40 ± 5) °С в течение 10 мин. За

это время смесь перемешивают три раза, энергично встряхивая пробирку. Пробы центрифугируют 10 мин при 4000 г и температуре 4 °С.

Отбирают дозатором 50 мкл водного слоя и переносят в отдельную пробирку. Добавляют 450 мкл буфера 1, входящего в состав тест-системы. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения зависит от жирности масла: 19,5 (масло 82,5 %, 84 % жирности); 20,5 (масло 75 %, 78 % жирности); 21,5 (масло 70 %, 72,5 % жирности); 22,5 (масло 65 %, 67 % жирности); 25 (масло 50 % жирности).

6.2.8 Подготовка проб сгущенного молока

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, и тщательно перемешивают.

В стаканы вместимостью 100 мл или 150 мл помещают две параллельные навески массой 25,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г. В стаканы с навесками добавляют порциями дистиллированную воду, нагретую до температуры 30 °С, и перемешивают содержимое стеклянной палочкой до образования однородной смеси. Затем переносят растворенное сгущенное молоко в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Далее пробы сгущенного молока подвергают процедуре обезжиривания, проводя центрифугирование в течение 10 мин при 3000 г 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10–15 мин, охлаждая пробы до температуры 2–4 °С.

Шпателем удаляют верхний жировой слой. Отбирают 2 мл обезжиренного молока чистым наконечником и переносят в чистую пробирку.

В отдельные пробирки вносят по 450 мкл буфера 2, входящего в состав тест-системы, и прибавляют по 50 мкл проб обезжиренного сгущенного молока. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 40.

6.2.9 Подготовка проб яиц и яичного порошка

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

Яйцо освобождают от скорлупы и гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Образец яичного порошка перемешивают и восстанавливают в соответствии с ГОСТ 30364.0 п.5.2.2. Перед отбором навесок восстановленный яичный порошок тщательно перемешивают.

От гомогенизированного образца яиц или восстановленного яичного порошка отбирают две параллельные навески массой 4,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают в центрифужные пробирки вместимостью 50 мл. В каждую пробирку с пробой добавляют по 20 мл смеси буфера Макилвейна с метанолом (1:1 по объему), приготовленной по п. 5.3.5. Содержимое пробирок перемешивают 15 мин вручную или при

переворачивании на ротаторе при скорости 60 об/мин в течение 15 мин. Затем пробирки центрифугируют в течение 10 мин при 4000 g и температуре (20–25) °С.

В отдельные пробирки вносят по 450 мкл буфера 1, входящего в состав тест-системы, и прибавляют по 50 мкл надосадочной жидкости. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 60.

6.2.10 Подготовка проб творога, творожных продуктов, кефира, йогурта, сметаны, айрана, ряженки, простокваши и других кисломолочных продуктов

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

При наличии в образцах немолочных компонентов, в т.ч. глазури, их отбрасывают. Образцы творога, творожных продуктов гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Образцы кефира, йогурта, сметаны, айрана, ряженки, простокваши тщательно перемешивают.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 5,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают их в центрифужные пробирки вместимостью 15 мл. Пробирки выдерживают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 15 мин, после чего сразу перемешивают на вортексе до образования гомогенной смеси. Пробы центрифугируют в течение 10 мин при 4000 g и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки с пробами перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10–15 мин.

В отдельные пробирки отбирают по 50 мкл надосадочной жидкости и вносят буфер 2, входящий в состав тест-системы, следующим образом:

по 500 мкл – для проб сметаны жирностью выше 15 % и творога жирностью выше 5 %;

по 450 мкл – для остальных продуктов.

Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и используют для анализа. Фактор разведения 10.

7 ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

7.1 Предварительная подготовка и правила обращения с тест-системой

Тест-систему извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре (20–25) °С от 0,5 до 1 ч, доводят температуру компонентов до значений температуры окружающей среды.

Перед использованием компоненты тест-системы необходимо аккуратно перемешать круговыми движениями флаконов.

Замена отдельных реагентов на компоненты из тест-систем других партий или других производителей не допускается.

Не допускается использование реагентов, имеющих следующие признаки распада: голубая окраска раствора хромоген-субстратной смеси до внесения его в лунки.

7.2 Подготовка микропланшет-иммуносорбента

Микропланшет-иммуносорбент со стрипами, предварительно подготовленный в соответствии с п.7.1, 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 (2–8) °С в течение шести 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 необходимо для каждой из параллельных проб образца.

Не следует использовать более шести стрипов в одной группе исследований.

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₁	C ₁	X ₃	X ₃	X ₁₁	X ₁₁						
B	C ₂	C ₂	X ₄	X ₄	X ₁₂	X ₁₂						
C	C ₃	C ₃	X ₅	X ₅	X ₁₃	X ₁₃						
D	C ₄	C ₄	X ₆	X ₆	X ₁₄	X ₁₄						
E	C ₅	C ₅	X ₇	X ₇	X ₁₅	X ₁₅						
F	C ₆	C ₆	X ₈	X ₈	X ₁₆	X ₁₆						
G	X ₁	X ₁	X ₉	X ₉	X ₁₇	X ₁₇						
H	X ₂	X ₂	X ₁₀	X ₁₀	X ₁₈	X ₁₈						

C₁ – C₆ – градуировочные растворы в лунках А–F стрипов №1 и №2,

X₁ – X₁₈ – растворы подготовленных проб в лунках G–H стрипов №1 и №2 и в лунках А–H стрипов № (3–6)

Рисунок – Схема расположения проб в лунках микропланшета-иммуносорбента

7.3 Приготовление градуировочных растворов

В качестве градуировочного раствора C₁ используют буфер 1 или буфер 2, подготовленные по п. 7.1

7.3.1 Приготовление градуировочного раствора C₆

К содержимому флакона с лиофилизированным стандартом тетрацилина (с концентрацией 1,8 нг/мл в восстановленном препарате) добавляют отмеренные дозатором 2,0 мл буфера 1. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 30 с. При анализе проб

молока, восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, мороженого, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, сгущенного молока, кисломолочных продуктов вместо буфера 1 используют буфер 2.

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

7.3.2 Приготовление градуировочных растворов C_2 – C_5

Градуировочные растворы C_2 – C_5 готовят путем последовательного разбавления градуировочного раствора C_6 следующим образом. В пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл или стеклянные пробирки вместимостью 5 мл вносят аликвоту буфера 1 или буфера 2 и аликвоту исходного градуировочного раствора. Исходный градуировочный раствор, от которого отбирается аликвота, и объемы аликвот, используемые для приготовления градуировочных растворов C_2 – C_5 , указаны в таблице 2. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

Приготовленные градуировочные растворы C_2 – C_5 хранению не подлежат.

Таблица 2 – Схема приготовления градуировочных растворов

Приготавливаемый градуировочный раствор		Исходный градуировочный раствор		Объем аликвоты буфера 1 или буфера 2, мл
Обозначение	Концентрация тетрациклина, нг/мл (мкг/л)	Обозначение	Объем аликвоты, мл	
C_6	1,80	-	-	2,0
C_5	0,60	C_6	0,3	0,6
C_4	0,30	C_5	0,3	0,3
C_3	0,15	C_4	0,3	0,3
C_2	0,05	C_3	0,3	0,6
C_1	0,00	-	-	0,3

Примечание – Буфер 1 используется для приготовления градуировочных растворов при исследовании проб меда, мяса, рыбы, продуктов из рыбы, готовых мясных продуктов, жиров животных, шпика, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных, сыра, масла, яиц и яичного порошка, подготовленных по пп. 6.2.3-6.2.7, п. 6.2.9; буфер 2 – при исследовании проб молока, восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, мороженого, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, сгущенного молока, кисломолочных продуктов, подготовленных по пп. 6.2.1-6.2.2, п. 6.2.8, п. 6.2.10.

7.4 Приготовление рабочего раствора конъюгата

К содержимому флакона с лиофилизированным конъюгатом добавляют отмеренные дозатором 6,0 мл раствора для разведения конъюгата и тщательно перемешивают, избегая пенообразования.

Рабочий раствор конъюгата хранят при температуре не выше минус 18 °С не более трех месяцев.

7.5 Приготовление рабочего раствора моющего буфера.

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

Рабочий моющий буфер готовят в стакане вместимостью 500 мл, в который вносят отмеренную дозатором или цилиндром аликвоту концентрата моющего буфера и добавляют отмеренный цилиндром в 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 (2–8) °С – один месяц.

7.6 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.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 В лунки микропланшета-иммуносорбента в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 50 мкл градуировочных растворов C_1 – C_6 , приготовленных по п. 7.3, в порядке возрастания их концентраций и растворов исследуемых проб, приготовленных в соответствии с п. 6.2.

8.2 Во все лунки микропланшета-иммуносорбента вносят по 50 мкл рабочего раствора конъюгата, приготовленного в соответствии с п. 7.4. Перемешивают содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола.

ВНИМАНИЕ! Суммарное время внесения всех реагентов по пп. 8.1 и 8.2 не должно превышать 10 мин с тем, чтобы минимизировать возможные артефакты, обусловленные разным временем протекания иммунохимической реакции в первых и последних лунках.

8.3 Микропланшет-иммуносорбент заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре (20–25) °С в течение 60 мин, исключая попадание света на планшет.

8.4 После окончания 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 250 мкл моющего буфера, приготовленного по п. 7.5, и затем выливая его резким переворачиванием планшета. Моющий буфер предварительно вносят в чистую ванночку в объеме из расчета 8,0 мл на один стрип.

После последнего промывания лунок остатки жидкости удаляют, постукивая перевернутым планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

Необходимо соблюдать следующие требования к промыванию планшета:

- при использовании автоматического или полуавтоматического устройства выполнять промывку в соответствии с прилагаемой программой;
- на всех этапах промывания контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости из них;
- не допускать переполнения лунок и перетекания жидкости между ними.

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

8.5 В каждую лунку микропланшета-иммуносорбента с помощью дозатора вносят по 100 мкл свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п. 7.6, или соответствующего готового реагента из тест-системы. 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 (20–25) °С.

8.6 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. Растворы в лунках должны окраситься в желтый цвет.

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

9. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Расчеты без использования программного обеспечения

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

Строят градуировочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая по линейной оси ординат значения ОП в о. е. или B_i/B_1 , в процентах, а по логарифмической оси абсцисс – значения концентраций тетрациклина, выраженные в мкг/л, в соответствующих градуировочных растворах.

По градуировочному графику определяют содержание антибиотиков группы тетрациклинов в исследуемых образцах продуктов (градуировка оси абсцисс в мкг/л соответствует содержанию тетрациклина 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 антител с конъюгатом тетрациклина. Это проявляется в снижении ОП или B_i/B_1 в лунках с пробами исследуемых продуктов, которые заведомо не содержат тетрациклин. Измерение кажущихся концентраций холостых образцов C_x и расчет стандартных отклонений (SD) позволяют найти предел обнаружения ПО = $C_x + 3SD$ и предел количественного определения ПКО = $C_x + 6SD$.

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

9.2 Расчеты с использованием программного обеспечения

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

10 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

10.1 Параметры ИФА градуировочных растворов – связывание конъюгата в присутствии тетрациклина: V_1 – от 1,3 до 2,7; V_2/V_1 – не более 95 %, V_6/V_1 – не более 40 %.

10.2 Чувствительность: минимальная концентрация тетрациклина в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью тест-системы ($V_1 - 2 SD$), не превышает 0,05 мкг/л.

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

10.4 Специфичность. В тест-системе при анализе используются антитела, проявляющие перекрестную чувствительность к антибиотикам группы тетрациклина. Относительно тетрациклина (100 %) значения кросс-реактивностей 4-эпитетрациклин – 87 %, окситетрациклин – 52 %, хлортетрациклин – 51 %, 4-эпиокситетрациклин – 49 %, 4-эпихлортетрациклин – 33 %, доксициклин – 23 %.

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

10.6 Пределы количественного определения представлены в таблице 3.

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

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

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

11.1 Тест-система должна храниться в упаковке изготовителя при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности. Допустимо хранение тест-системы при температуре до 25 °С не более 3 сут. Замораживание тест-системы и отдельных компонентов не допускается (за исключением восстановленных по п. 7.3 и п. 7.4 стандарта тетрациклина и конъюгата).

11.2 Неиспользованные стрипы микропланшета-иммуносорбента должны храниться в герметично закрытом фольгированном пакете при температуре (2–8) °С не более шести месяцев.

11.3 Концентрат моющего буфера, буферные растворы 1 и 2, раствор для разведения конъюгата, хромоген-субстратный раствор (раствор хромогена и субстратный буферный раствор), и стоп-реагент после вскрытия флаконов и последующей укупорки хранят при температуре (2–8) °С в течение срока годности тест-системы.

Восстановленный стандарт тетрациклина должен храниться при температуре не выше минус 18 °С в течение не более одного месяца, восстановленный конъюгат – при температуре не выше минус 18 °С не более трех месяцев.

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

Таблица А – Схема анализа

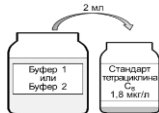
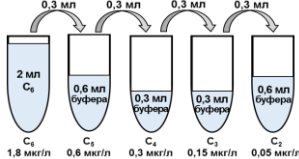

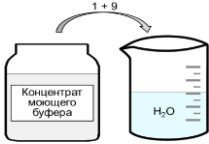
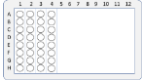



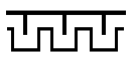
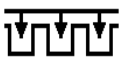
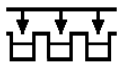

Название стадии	Схематическое представление	Описание стадии
1. Приготовление градуировочного раствора С ₆		Восстановить стандарт тетрациклина в 2 мл буфера 1 или буфера 2.
2. Приготовление градуировочных растворов С ₂ –С ₆		Провести последовательное разведение раствора тетрациклина С ₆ буфером 1 или буфером 2
3. Приготовление рабочего раствора конъюгата		Восстановить лиофилизированный конъюгат в 6 мл раствора для разведения конъюгата
4. Приготовление рабочего раствора мощного буфера		Разбавить концентрат мощного буфера дистиллированной водой в 10 раз
5. Подготовка микропланшета-иммуносорбента		Вставить в рамку необходимое количество стрипов с иммобилизованными антителами
6. Внесение в лунки градуировочных растворов и растворов исследуемых проб		Добавить по 50 мкл градуировочного раствора или подготовленного раствора пробы в соответствующую лунку микропланшета-иммуносорбента
7. Внесение конъюгата		Добавить по 50 мкл рабочего раствора конъюгата в каждую лунку
8. Инкубация		Выдержать при температуре (20–25) °С в темноте в течение 60 мин
9. Промывание		Промыть три раза рабочим раствором мощного буфера порциями по 250 мкл на каждую лунку
10. Проведение ферментативной реакции		Добавить в каждую лунку по 100 мкл хромоген-субстратного раствора и выдержать 15 мин в темноте при температуре (20–25) °С
11. Остановка ферментативной реакции		Добавить в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента
12. Измерение оптической плотности		Измерить на микропланшетном фотометре, длина волны 450 нм

Таблица Б – Возможные проблемы при проведении анализа и пути их решения

Проблема	Причина	Решение
1. Высокий фон (ОП пробы С₆ больше 0,60)	Неудовлетворительная промывка	Обязательно выполняйте указанное в инструкции число промывок (п. 8.4). 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 правильность приготовления рабочего раствора конъюгата (п. 7.4). 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 (20–25) °С (п.8.3), вторую – в течение 15 мин при температуре (20–25) °С (п. 8.5)
2. Показания низкой абсорбции (ОП калибровочной пробы С₁ ниже 1,3)	Недостаточно конъюгата	Проверьте правильность приготовления рабочего раствора конъюгата (п. 7.4). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	В лунки микротитровального планшета внесены неправильные объемы реагентов	Вносите в лунки реагенты в объемах, указанных в п. 8. Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	Срок годности реагентов истек, неправильное хранение тест-системы	Обеспечьте правильное хранение тест-системы и восстановленного рабочего раствора конъюгата (п. 7.4). Не используйте тест-систему после истечения ее срока годности (п.11).

	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 мин перед проведением анализа. Выполняйте первую стадию анализа в течение 60 мин при температуре (20–25) °С (п.8.3), вторую – в течение 15 мин при температуре (20–25) °С (п. 8.5)
	Концентрат моющего буфера не разбавлен	Убедитесь, что 10-кратный концентрат моющего буфера разбавлен дистиллированной водой в 10 раз перед использованием. Для приготовления рабочего раствора 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 > 2,7)	Избыток конъюгата	Проверьте правильность приготовления рабочего раствора конъюгата (п. 7.4). 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 мин перед проведением анализа. Выполняйте первую стадию анализа в течение 60 мин при температуре (20–25) °С (п.8.3), вторую – в течение 15 мин при температуре (20–25) °С (п. 8.5). Сократите время проведения ферментативной реакции более ранним внесением стоп-реагента

	Неудовлетворительная промывка	Выполняйте указанное в инструкции число промывок (п. 8.4). 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	Замените хромоген-субстратный раствор аналогичным раствором этой же партии. При раскапывании раствора конъюгата и хромоген-субстратного раствора многоканальным полуавтоматическим дозатором необходимо использовать два разных лотка для каждого из реагентов.
4. Высокий разброс значений в парах лунок (коэффициент вариации KV > 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 восстановления лиофилизированного конъюгата (п.7.4)
	Нижняя наружная поверхность микропланшета загрязнена	Перед внесением в лунки хромоген-субстратного раствора переверните планшет вверх 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	Выполняйте указанное в инструкции число промывок (п. 8.4). Для приготовления рабочего раствора 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. 7.3. Для приготовления всех градуировочных растворов используйте только один из буферов (1 или 2). Вносите стандарты в лунки микротитровального паншета в порядке возрастания их концентраций



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