

«ПРОДОСКРИН® Хлорамфеникол»

Тест-система для определения хлорамфеникола
методом иммуноферментного анализа

Версия 2.0

TU BY 100185129.147-2015

Разработано

в Институте биоорганической химии НАН Беларуси



Видеоинструкция на YouTube:

https://www.youtube.com/watch?v=G_dCzn7p4Q8

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

+7 499 911 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 444 05 50



«ПРОДОСКРИН® Хлорамфеникол»

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система «ПРОДОСКРИН® Хлорамфеникол» предназначена для определения остаточных количеств хлорамфеникола в пищевых продуктах и продовольственном сырье животного происхождения, включающих мясо, рыбу, креветки, рыбную муку, продукты из рыбы, готовые мясные продукты, жиры животные, шпик, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, молоко (сырое, пастеризованное и стерилизованное), молоко сухое восстановленное и сгущенное молоко, коктейли молочные, мороженое на молочной основе, молочные смеси для детского питания, молочную сыворотку и восстановленную молочную сыворотку, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и др.), творог, творожные продукты, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, яйцо и яичный порошок, мед методом иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2 L-хлорамфеникол или левомицетин является природным антибиотиком широкого спектра действия: активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий и анаэробов. Установлено, что хлорамфеникол медленно выводится из организма животных и сравнительно долго сохраняет свою активность при хранении продуктов. При попадании в организм человека хлорамфеникол оказывает токсическое воздействие на кроветворные органы, что может приводить к развитию апластической анемии и других патологий. В этой связи применение хлорамфеникола для лечения продуктивных животных запрещено. Такой запрет действует в ЕС (Директива 2377/90), в Беларуси (СанПиН 11 63 РБ 98) и в Таможенном союзе (Решение Комиссии Таможенного союза № 299 от 28.05.2010 «О применении санитарных мер в Таможенном союзе»), причем все документы не допускают содержания остаточных количеств данного антибиотика в продукции животного происхождения. Решением Комиссии ЕС в 2003 году установлен минимальный требуемый рабочий предел для методов определения остаточных количеств хлорамфеникола в продуктах и сырье – 0,3 мкг/кг (мкг/л).

1.3 Тест-система рассчитана на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых (неизвестных) проб и 6 градуировочных растворов, всего 96 определений в диапазоне концентраций 0,025–0,750 мкг/л или мкг/кг. Конструкция тест-системы позволяет осуществить несколько постановок ИФА: например, одна постановка – 4 стрипа (32 лунки). Продолжительность анализа составляет 1 ч без учета пробоподготовки.

2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

Таблица 1 – Состав тест-системы

Компонент тест-системы	Количество в комплекте
Микропланшет-иммуносорбент, планшет с иммобилизованными антителами	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
Градуировочные растворы (С ₁ –С ₆) с концентрациями хлорамфеникола в диапазоне (0–0,750) мкг/л, (точные значения концентраций указываются в паспорте к тест-системе)	6 микропробирок или флаконов по 1,3 мл
Конъюгат хлорамфеникола и пероксидазы из корней хрена, 11-кратный концентрат	1 микропробирка или флакон, 0,7 мл
Буфер для разведения конъюгата	1 флакон, 10 мл
Моющий буфер, 10-кратный концентрат	1 флакон, 100 мл
Субстрат	1 флакон, 14 мл
Хромоген (раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, ТМБ)	1 флакон, 0,7 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл
Клейкая пленка	1 штука

Примечание – По усмотрению изготовителя и по заказу потребителя в состав тест-системы может быть включен хромоген-субстратный раствор в виде готового к использованию компонента вместо растворов хромогена и субстрата, 1 флакон, 14 мл.

Примечание – клейкая пленка используется для хранения иммуносорбента после вскрытия вакуумной упаковки для защиты лунок от попадания в них влаги.

2.2 Принцип метода основан на прямом конкурентном иммуноферментном анализе. Применяются микропланшеты с иммобилизованными антителами к хлорамфениколу.

В лунки планшетного иммуносорбента вносят градуировочные растворы или исследуемые пробы и конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой. Во время инкубации конъюгат хлорамфеникол-пероксидаза и хлорамфеникол в составе пробы конкурируют за связывание с поликлональными антителами к хлорамфениколу, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Чем больше содержится хлорамфеникола в пробе, тем меньше конъюгата связывается с антителами на твердой фазе. После удаления несвязавшихся реагентов и промывки планшета моющим буфером в лунки вносят раствор субстрата пероксидазы (пероксид водорода) и хромогена (ТМБ). Развивается цветная реакция, которую останавливают путем добавления стоп-реагента (1 М рас-

твор серной кислоты). Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют в многоканальном планшетном спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП обратно пропорциональна концентрации хлорамфеникола в пробе. По градуировочной кривой рассчитывается концентрация хлорамфеникола в пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

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

3.2 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией. При работе с метанолом и его растворами следует строго соблюдать требования инструкции по технике безопасности при работе с метанолом, утвержденной в установленном порядке.

3.3 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть раствор кислоты большим количеством воды.

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

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

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ

4.1 Для исключения некорректных результатов исследуемые образцы продуктов необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Пробу каждого образца, а также реагенты тест-системы необходимо отбирать отдельным наконечником к пипетке.

4.2 Не допускается использование тест-системы после окончания срока годности, а также смешивание компонентов тест-систем разных серий.

4.3 Перед постановкой анализа все компоненты тест-системы должны быть доведены до комнатной температуры (20–25) °С.

4.4 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость.

4.5 Вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта. Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе специализированного моющего средства промывают водопроводной и ополаскивают дистиллированной водой, высушивают. Запрещается много-

кратное использование одноразовой лабораторной посуды и применение бытовых моющих средств для мойки посуды.

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

4.7 Если проведение ИФА начато, то все последовательные стадии следует заканчивать, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени. Необходимо исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

4.8 Необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %), а также аттестованный прибор для измерения оптической плотности (планшетный спектрофотометр).

4.9 Во время проведения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности. Не следует держать компоненты на ярком свете во время инкубации или при хранении.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

- весы лабораторные общего назначения с точностью взвешивания 0,01 г;

- автоматический фотометр, позволяющий измерять ОП раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов, 8- или 12- канальное (не обязательно);

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- пипетки 8-канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- гомогенизатор тканей лабораторный или блендер бытовой;

- лабораторный шейкер, обеспечивающий частоту вращения до 300 об/мин;

- вортекс лабораторный, обеспечивающий частоту вращения до 3000 об/мин;

- лабораторный ротатор, обеспечивающий частоту вращения до 60 об/мин;
- лабораторный миксер, обеспечивающий скорость в диапазоне от 200 об/мин до 2000 об/мин;
- центрифуга лабораторная с охлаждением до плюс 4 °С и скоростью вращения до 4000 г (пробирки вместимостью 15 мл и 50 мл) и не менее 20000 г (пробирки вместимостью 2 мл);
- холодильник бытовой с поддерживаемой температурой от плюс 2 °С до плюс 8 °С и морозильная камера с поддерживаемой температурой не выше минус 18 °С;
- рН-метр с диапазоном измерений от 0 рН до 14 рН и погрешностью $\pm 0,1$ рН в комплекте с электродами;
- система для сухого выпаривания проб в токе азота с регуляцией температуры (50–60) °С;
- термостат лабораторный;
- баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры в пределах (40–55) °С;
- цилиндры мерные вместимостью 25 мл, 50 мл и 100 мл;
- стаканы мерные вместимостью 150 мл и 1000 мл;
- колбы мерные вместимостью 50 мл, 100мл и 1000 мл;
- колбы конические вместимостью 250 мл и 500 мл;
- флаконы из пластмассы вместимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой;
- флакон из пластмассы черного цвета вместимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой;
- ванночки (кюветы) для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри для отбора жидкостей многоканальной пипеткой;
- изолирующая пленка для заклеивания планшетов;
- бумага фильтровальная;
- перчатки хирургические резиновые или пластиковые;
- пробирки полипропиленовые центрифужные с колпачком (типа Фалкон) вместимостью 50 мл и 15 мл;
- пробирки стеклянные для выпаривания вместимостью 5 мл или 10 мл;
- пробирки полипропиленовые центрифужные с крышкой (типа Эппендорф) вместимостью 2 мл;
- штативы для пробирок;
- шпатели пластиковые;
- пипетки Пастера;
- палочки стеклянные оплавленные.

5.2 При работе с тест-системой используются следующие реактивы:

- метанол ч.д.а по ГОСТ 6995;
- гексан ч. по ТУ 6-09-3375;
- этилацетат (для ГХ) по ГОСТ 22300;
- вода дистиллированная и деионизованная;
- цинк сернокислый семиводный х.ч. по ГОСТ 4174;
- калий железистосинеродистый 3-водный ч.д.а. по ГОСТ 4207;
- натрия фосфат двуосновной дигидрат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или натрий фосфорнокислый 2-замещенный, 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 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;
- натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233;
- натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328
- азот газообразный повышенной чистоты 1 сорт по ГОСТ 9293.

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

5.3 Приготовление растворов

5.3.1 Приготовление растворов Карреза

Для приготовления раствора Карреза 1 навеску 7,6 г калия железистосинеродистого 3-водного (ГОСТ 4207) помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в небольшом количестве воды, доводят до метки и перемешивают. Раствор Карреза 2 готовят аналогичным образом путем растворения 15 г цинка сернокислого 7-водного (ГОСТ 4174) в 50 мл дистиллированной воды. Приготовленные растворы хранят не более 7 дней в холодильнике.

5.3.2 Приготовление 20 мМ фосфатного буфера

Навески натрия фосфата одноосновного моногидрата 0,55 г (или натрия фосфорнокислого 1-замещенного, 2-водного 0,62 г), натрия фосфата двухосновного дигидрата 2,85 г (или натрия фосфорнокислого 2-замещенного, 12-водного 5,73 г), хлористого натрия 9,0 г помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и добавляют 500 мл дистиллированной воды. Перемешивают содержимое колбы до полного растворения соли, доводят до метки дистиллированной водой. Устанавливают pH раствора до 7,4 с помощью 30 %-ого раствора гидроокиси натрия.

5.3.3 Приготовление растворов метанола

Раствор метанола (1:9 по объему)

В емкость из темного стекла приливают отмеренные цилиндром 225 мл дистиллированной воды и 25 мл метанола и перемешивают.

Раствор метанола (2:8 по объему)

В емкость из темного стекла приливают отмеренные цилиндром 200 мл дистиллированной воды и 50 мл метанола и перемешивают.

Растворы метанола хранят при комнатной температуре в плотно закрытой пробками емкости не более одного месяца в соответствии с установленными правилами хранения метанола и его растворов.

6 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

6.1 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы хранят в защищенном от света месте при температуре (2–8) °С не более 48 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не выше минус 20 °С) не более одного раза и хранение в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб, замороженные образцы должны быть разморожены при температуре (2–8) °С.

6.2 Подготовка проб мяса, рыбы, креветок, продуктов из рыбы, готовых к употреблению мясных продуктов, жиров животных, шпика, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных

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

Исследуемые образцы мышечной ткани млекопитающих, рыбы или птицы в случае необходимости освобождают от жира и соединительной ткани, с готовых к употреблению мясных продуктов удаляют оболочку и поверхностный слой. Образец гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Навеску образца массой 3,0 г помещают в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл, добавляют в пробирку 3 мл воды и 6 мл этилацетата. После интенсивного десятиминутного перемешивания на шейкере или при переворачивании на ротаторе, пробу центрифугируют 10 мин при 3000 г и температуре (20–25) °С. Отбирают 4 мл надосадочной жидкости (этилацетатный слой), переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл гексана, добавляют 0,5 мл буфера для разведения исследуемых проб (приготовленного согласно п.7.2) и интенсивно перемешивают на вортексе. Затем центрифугируют 10 мин при 3000 г и температуре (20–25) °С. Верхний слой (гексан) и слой жира между гексаном и водным раствором отбрасывают, а раствор используют для анализа. Фактор разведения 0,25.

6.3 Подготовка проб молока и молочных продуктов

6.3.1 Молоко сырое, пастеризованное и стерилизованное, сухое восстановленное молоко, сухие молочные смеси для детского питания, мороженое (прямое внесение пробы)

От образца мороженого предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают. Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при комнатной температуре. Образец сырого, пастеризованного, стерилизованного молока перемешивают путем встряхивания и переворачивания в упаковке. Образец мороженого тщательно перемешивают.

Пробы сухих молочных продуктов (молока сухого цельного или обезжиренного) восстанавливают в соответствии с ГОСТ 29245, п. 3.4.

Пробы сухих молочных продуктов массой 12,0 г, 12,5 г и 10,0 г (сухое молоко с содержанием жира 20 %, 25 % и иное, соответственно) и массой 9,0 г (сухое обезжиренное молоко), переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл и приливают небольшими порциями нагретую до температуры 40 °С дистиллированную воду при постоянном перемешивании. Доводят объем до метки дистиллированной водой и перемешивают на вортексе 10 мин. До начала анализа оставляют продукт в восстановленном виде минимум на 15 мин.

Пробы сухих молочных смесей для детского питания восстанавливают в соответствии с инструкцией производителя. Далее проводят процедуру обезжиривания проб, за исключением обезжиренного молока.

Для обезжиривания образцы молока сырого, стерилизованного, пастеризованного или восстановленного сухого, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, мороженого перемешивают, не допуская вспенивания, и отбирают пробы в чистые центрифужные пробирки вместимостью 15 мл, центрифугируют 10 мин при 3000 г и 10°С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение (10–15) мин, охлаждая пробы молока до температуры (2–4) °С.

Шпателем удаляют верхний жировой слой. Отбирают 2 мл обезжиренного молока чистым наконечником и переносят в чистую пробирку. Доводят до комнатной температуры. Фактор разведения 1,0.

6.3.2 Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное и сухое восстановленное молоко, сухие восстановленные молочные смеси для детского питания, мороженое на молочной основе, коктейли молочные (экстракция)

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

Пробы сухих молочных продуктов (молока сухого цельного или обезжиренного) восстанавливают в соответствии с ГОСТ 29245 и п. 6.3.1. Пробы сухих молочных смесей для детского питания восстанавливают в соответствии с инструкцией производителя.

От образца мороженого предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают, доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

В центрифужную пробирку вместимостью 15 мл отбирают 10 мл восстановленного сухого молока, восстановленной сухой молочной смеси для детского питания или молока (сырого, пастеризованного, стерилизованного), коктейля молочного либо 10 г мороженого, добавляют 0,5 мл раствора Карреза 1 и тщательно перемешивают. Далее в пробирки добавляют 0,5 мл раствора Карреза 2, перемешивают на вортексе 1 мин и центрифугируют 10 мин при 3000 г и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение (10–15) мин, охлаждая пробы молока до температуры (2–4) °С.

Переносят 4,4 мл надосадочного слоя в чистые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл и добавляют 8 мл этилацетата. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют 10 мин при 3000 г и температуре (20–25) °С. Отбирают 4 мл надосадочной жидкости, переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 0,4 мл буфера для разведения исследуемых проб (приготовленного согласно п.7.2) и интенсивно перемешивают на вортексе. Фактор разведения 0,2.

6.3.3 Сгущенное молоко

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

Навеску массой 5,0 г помещают в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, добавляют 5 мл дистиллированной воды и перемешивают содержимое на вортексе до образования однородной смеси. Затем в пробирки добавляют 0,5 мл раствора Карреза 1, тщательно перемешивают. Далее добавляют 0,5 мл раствора Карреза 2, перемешивают на вортексе в течение 1 мин и центрифугируют 10 мин при 3000 г и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение (10–15) мин, охлаждая до температуры (2–4) °С.

Переносят 4 мл надосадочной жидкости в чистую центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и добавляют 8 мл этилацетата. После интенсивного десятиминутного перемешивания на шейкере или при переворачивании на ротаторе, пробу центрифугируют 10 мин при 3000 г и температуре (20–25) °С. Отбирают 4 мл надосадочной жидкости, переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 0,4 мл буфера для разведения исследуемых проб (приготовленного согласно п.7.2) и интенсивно перемешивают на вортексе. Фактор разведения 0,4.

6.4 Подготовка проб йогурта и других кисломолочных продуктов, молочной сыворотки и восстановленной сухой молочной сыворотки

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при комнатной температуре. При наличии в образцах йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают.

Сухую молочную сыворотку массой 6,25 г переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют дистиллированную воду до полного растворения образца при перемешивании и доводят до метки дистиллированной водой. Пробу тщательно перемешивают.

Образцы йогурта и других кисломолочных продуктов гомогенизируют и вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл навеску массой 10,0 г. От образца молочной сыворотки или восстановленной сухой молочной сыворотки отбирают навески массой 10,0 г и помещают в пробирки вместимостью 50 мл. Добавляют 8 мл 20 мМ фосфатного буферного раствора, приготовленного в соответствии с п.5.3.2, и перемешивают содержимое на вортексе. Затем в пробирки добавляют 1 мл раствора Карреза 1, тщательно перемешивают. Далее добавляют 1 мл раствора Карреза 2, перемешивают при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин и центрифугируют 10 мин при 3000 г и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение (10–15) мин, охлаждая до температуры (2–4) °С.

Переносят 4 мл надосадочной жидкости в чистую центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и добавляют 8 мл этилацетата. После интенсивного десятиминутного перемешивания на шейкере или при переворачивании на ротаторе, пробу центрифугируют 10 мин при 3000 г и температуре 20–25 °С. Отбирают 4 мл надосадочной жидкости, переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 0,4 мл буфера для разведения исследуемых проб (приготовленного согласно п.7.2) и интенсивно перемешивают на вортексе. Фактор разведения 0,4.

6.5 Творог, творожные продукты

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

Вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл пробы массой 2,0 г. Добавляют 16 мл 20 мМ фосфатного буферного раствора, приготовленного в соответствии с п.5.3.2, и перемешивают содержимое на вортексе. Затем в пробирки добавляют 1 мл раствора Карреза 1, тщательно перемешивают. Далее добавляют 1 мл раствора Карреза 2, перемешивают при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин и центрифугируют 15 мин при 3000 г и 10 °С. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение (10–15) мин, охлаждая до температуры (2–4) °С.

Переносят 4 мл надосадочной жидкости в чистую центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и добавляют 8 мл этилацетата. После интенсивного десятиминутного перемешивания на шейкере или при переворачивании на ротаторе, пробу центрифугируют 10 мин при 4000 g и температуре (20–25) °С. Отбирают 4 мл надосадочной жидкости, переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 0,4 мл буфера для разведения исследуемых проб (приготовленного согласно п.7.2) и интенсивно перемешивают на вортексе. Фактор разведения 2,0.

6.6 Сыр

Доводят температуру образца до (20–25) °С, выдерживая его при комнатной температуре. Отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают.

Навески сырной массы весом 15,0 г помещают в стаканы вместимостью 150 мл или в контейнеры, входящие в комплект миксера. К навескам добавляют 30 мл раствора метанола (1:9 по объему) и гомогенизируют с использованием лабораторного миксера, не допуская разбрызгивания смеси. Переносят гомогенизированную смесь в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 мл и выдерживают емкости на водяной бане при температуре (40–45) °С в течение 10 мин, периодически интенсивно встряхивая содержимое. Затем пробирки помещают на лед и выдерживают в течение 15 мин. Проводят центрифугирование проб в течение 15 мин при 3000 g и 4 °С. Переносят 4,8 мл надосадочной жидкости в чистую центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и добавляют 8 мл этилацетата. После интенсивного десятиминутного перемешивания на шейкере или при переворачивании на ротаторе, пробу центрифугируют 10 мин при 3000 g и температуре (20–25) °С. Отбирают 4 мл надосадочной жидкости, переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 1,0 мл буфера для разведения исследуемых проб (приготовленного согласно п.7.2) и интенсивно перемешивают на вортексе. Фактор разведения 1,0.

6.7 Масло

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

Навеску массой 1,0 г помещают в центрифужные пробирки вместимостью 15 см и выдерживают на водяной бане при температуре (40–45) °С до полного расплавления масла. Сразу же после расплавления в пробирки добавляют 1 мл гексана и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 20 с. Добавляют 1 мл раствора метанола (2:8 по объему) и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 20 с, а затем на шейкере или при переворачивании на ро-

таторе в течение 10 мин. Пробу центрифугируют 10 мин при 2000 г и температуре 4 °С. Осторожно удаляют верхний гексановый слой пипеткой Пастера.

В пробирки снова добавляют 1 мл гексана и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 20 с. Центрифугируют пробы 10 мин при 2000 г и температуре 4 °С, после чего осторожно удаляют верхний гексановый слой пипеткой Пастера.

Переносят 0,7 мл водного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл и помещают на лед. Выдерживают пробы 10 мин и проводят центрифугирование при 20 000 г и температуре (20–25) °С в течение 5 мин.

Отбирают 0,2 мл водной фазы и переносят в стеклянную пробирку вместимостью 5 мл. Затем добавляют 0,7 мл буфера для разведения проб (приготовленного согласно п.7.2) и тщательно перемешивают на вортексе. Фактор разведения зависит от жирности масла: 5,2 (масло 82,5%, 84% жирности); 5,5 (масло 72,5%, 75%, 78% жирности); 5,7 (масло 70% жирности); 6,0 (масло 65%, 67% жирности); 6,7 (масло 50% жирности).

6.8 Яйца (сырое цельное яйцо и яичный порошок)

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

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.

В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл вносят 2,0 г гомогенизированного сырья или восстановленного продукта, добавляют 12 мл этилацетата. Пробу интенсивно перемешивают 10 мин на шейкере или при переворачивании на ротаторе и центрифугируют 10 мин при 3000 г и температуре (20–25) °С. Отбирают 6 мл надосадочной жидкости, переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл гексана, добавляют 1 мл буфера для разведения исследуемых проб (приготовленного согласно п.7.2) и интенсивно перемешивают в течение 1 мин. Снова центрифугируют 10 мин при 3000 г и температуре (20–25) °С. Верхний слой (гексан) и слой жира между гексаном и водным раствором отбрасывают, раствор используют для ИФА. Фактор разведения 1,0.

6.9 Мед

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

Для приготовления пробы меда в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл вносят 2,0 г образца меда и добавляют 4 мл теплой дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения навески. Добавляют 4 мл этилацетата, интенсивно перемешивают 10 мин на шейкере или при пе-

реворачивании на ротаторе и центрифугируют 10 мин при 3000 г при температуре (20–25) °С. Отбирают 1 мл верхнего этилацетатного слоя, переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл буфера для разведения исследуемых проб (приготовленного согласно п.7.2) и используют для ИФА. Фактор разведения 1,0.

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

7.1 Перед проведением ИФА компоненты тест-системы и исследуемые пробы выдерживают при комнатной температуре (20–25) °С в течение 30 мин. Перед использованием реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием.

7.2 Приготовление рабочего моющего буфера и буфера для разведения исследуемых проб

Содержимое флакона с концентратом моющего буфера интенсивно встряхивают в течение (10–20) с, в случае образования кристаллов – подогревают на водяной бане или помещают в ультразвуковую баню. Разводят нужный объем раствора в 10 раз (соотношение по объему 1+9) дистиллированной водой. Для этого в мерный стакан отбирают необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов, доводят дистиллированной водой до нужного объема и перемешивают полученный рабочий раствор. Приготовленный раствор можно хранить при (2–8) °С в течение 1 месяца.

Буфер для разведения исследуемых проб готовят аналогичным способом путем разведения необходимого объема концентрата моющего буфера в 10 раз (соотношение по объему 1+9) дистиллированной водой. В анализе используют свежеприготовленный раствор.

7.3 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Концентрат развести в 11 раз (соотношение по объему 1+10) буфером для разведения из расчета 50 мкл разбавленного раствора на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 мл вносят отмеренную дозатором необходимую аликвоту буфера для разведения конъюгата и добавляют отмеренную дозатором в десять раз меньшую по объему аликвоту концентрата конъюгата, после чего содержимое пробирки тщательно перемешивают круговыми движениями, не допуская образования пены.

Исходный концентрат конъюгата после отбора аликвоты для разведения следует сразу же поместить в холодильник.

Рабочий раствор конъюгата готовят не более чем за 15 мин до выполнения анализа.

7.4 Приготовление хромоген-субстратного раствора.

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

Раствор хромогена разводят субстратом в 21 раз (соотношение по объему 1+20) из расчета 100 мкл на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон из темной пластмассы вместимостью 20 мл вносят необходимое количество субстрата, добавляют соответствующее количество раствора хромогена и интенсивно перемешивают в течение (30–40) с.

Примечание: субстрат и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.

Приготовленный или поставленный в тест-системе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники при работе с хромоген-субстратным раствором.

7.5 Подготовка иммуносорбента

Планшетный иммуносорбент освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку.

Не рекомендуется одновременно использовать более 6 стрипов. При необходимости исследовать большее количество проб анализ выполняется в несколько этапов. Лунки маркируют следующим образом: С₁ – 2 лунки, С₂ – 2 лунки, С₃ – 2 лунки, С₄ – 2 лунки, С₅ – 2 лунки, С₆ – 2 лунки, Х₁ – по 2 лунки (таблица 2).

Таблица 2– Схема маркировки лунок для ИФА

	1	2	3	4	5	6
A	C ₁	C ₅	X ₃	X ₇	...	
B	C ₁	C ₅	X ₃	X ₇	...	
C	C ₂	C ₆	X ₄	X ₈		
D	C ₂	C ₆	X ₄	X ₈		
E	C ₃	X ₁	X ₅	X ₉		
F	C ₃	X ₁	X ₅	X ₉		
G	C ₄	X ₂	X ₆	X ₁₀		
H	C ₄	X ₂	X ₆	X ₁₀		

Примечание – (С₁–С₆) – лунки для градуировочных растворов, Х₁ – лунки для исследуемых проб продуктов. При анализе используют две параллельные пробы (навески) каждого образца продукта.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

8.2 Во все лунки вносят по 50 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении (п. 7.3). 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 15 мин с тем, чтобы минимизировать возможные артефакты, обусловленные разным временем протекания иммунохимической реакции в первых и последних лунках.

8.3 Планшет заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при комнатной температуре (20–25) °С в течение 30 мин.

8.4 После окончания инкубации проводят 3-кратную промывку планшета приготовленным моющим буфером (п. 7.2) с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки, добавляя в каждую лунку по 250 мкл раствора. При ручной промывке удаляют содержимое из всех лунок путем резкого переворачивания планшета или аспирации, затем все лунки промывают 3 раза моющим буфером и удаляют остатки влаги, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

Необходимо соблюдать следующие требования к промыванию планшета:

- при использовании автоматического или полуавтоматического устройства 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;
- выдерживать лунки, заполненным раствором для отмывания, не менее 10 с.

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

8.5 В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора (п. 7.4) или готового хромоген-субстратного раствора, если он включен в состав тест-системы. Аккуратными круговыми движениями перемешивают содержимое лунок. Общее время добавления не должно превышать 2 мин. Планшет заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при (20–25) °С в темноте в течение 15 мин.

8.6 Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента в той же последовательности и с той же скоростью, которые использовались при добавлении хромоген-

субстратного раствора. Перемешивают содержимое лунок круговым движением планшета по ровной поверхности лабораторного стола. Растворы в лунках должны окраситься в желтый цвет.

8.7 В течение не более 15 мин после остановки реакции измеряют в планшетном спектрофотометре ОП растворов в лунках при длине волны 450 нм.

9. РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

9.1 Расчеты без использования программного обеспечения

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

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

По градуировочному графику определяют содержание хлорамфеникола в исследуемых образцах продуктов (градуировка оси абсцисс в мкг/л соответствует содержанию антибиотика в мкг/кг или ррб). При окончательных расчетах следует найденную по градуировочной кривой величину умножить на фактор разведения пробы.

Примечания:

1 Биологический матрикс проб исследуемых образцов продуктов и растворители, используемые для экстракции, оказывают неспецифическое ингибирующее действие на связывание конъюгата хлорамфеникол-пероксидаза с иммобилизованными антителами. Это проявляется в снижении ОП или V_i/V_0 в лунках с пробами исследуемых продуктов, которые заведомо не содержат хлорамфеникола. Измерение кажущихся концентраций холостых образцов C_x и расчет стандартных отклонений (SD) позволяют найти предел обнаружения $ПО = C_x + 3 SD$ и предел количественного определения $ПКО = C_x + 6 SD$.

2 Пробы со значениями концентраций ниже предела количественного определения следует рассматривать как отрицательные в отношении содержания хлорамфеникола. Выявленные при ИФА-скрининге положительные пробы (со значениями концентраций выше ПКО) подлежат проверке альтернативными аналитическими методами.

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».

Расчет расширенной неопределенности результатов измерений, проверку приемлемости результатов измерений, контроль стабильности результатов измерений и построение карт Шухарта можно производить с помощью программного обеспечения, разработанного ОДО «КомПродСервис».

10 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАБОРА

10.1 Параметры ИФА градуировочных растворов: связывание хлорамфеникола и конъюгата хлорамфеникол-пероксидаза: V_1 – от 1,3 до 2,7 о.е; V_2/V_1 – от 70 до 95 %, V_6/V_1 – от 5 до 40 %.

10.2 Чувствительность: минимальная концентрация хлорамфеникола в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью тест-системы ($V_1 - 2 SD$), не превышает 0,025 мкг/л.

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

10.4 Специфичность. В тест-системе используются высокоспецифичные антитела к хлорамфениколу, которые не дают перекрестной реакции с антибиотиками других классов. Относительно хлорамфеникола (100 %) значения кросс-реактивностей хлорамфеникол-основания, фторфеникола, тиамфеникола менее 1 %.

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

10.6 Пределы количественного определения (ПКО) представлены в таблице 3.

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

Продукт	ПКО, мкг/кг
Мясо, рыба, готовые к употреблению мясные продукты	0,0125
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное молоко (экстракционный метод)	0,010
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное молоко (прямой метод)	0,025
Йогурт и др. кисломолочные продукты, молочная сыворотка, восстановленная молочная сыворотка, сгущенное молоко	0,020
Творог	0,100
Сыр	0,025
Масло сливочное	0,13

Яйцо, яичный порошок	0,050
Мед	0,075

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1 Тест-система должен 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 суток. Замораживание целой тест-системы и отдельных компонентов не допускается.

11.2 Неиспользованные стрипы должны храниться в герметично закрытом полиэтиленовом пакете при температуре (2–8) °С не более 6 месяцев.

11.3 Концентраты конъюгата и моющего буфера, а также градуировочные растворы, буфер для разведения конъюгата, субстрат и хромоген (хромоген-субстратный раствор, если он включен в состав тест-системы), стоп-реагент после вскрытия флаконов и последующей укупорки можно хранить при температуре (2–8) °С в течение срока годности тест-системы.

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.

12 ОБЗОР ВЕРСИЙ

Номер версии	Описание
1.0	Первая версия
2.0	Внесены изменения в п. 2.1 – добавлена клейкая пленка