



МУЛЬТИСКРИН® ФУМОНИЗИН

Набор реагентов для определения фумонизинов группы В в пищевой продукции и кормах методом иммуноферментного анализа

Версия 2.2

РАЗРАБОТАНО
ОДО «КомПродСервис»

Анализ in vitro

Хранить при 2-8°C

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



Производитель:
ОДО "КомПродСервис"
ул. Филимонова, 25Г, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

Техническая поддержка
support@komprod.com
+375 17 336 50 54

Официальный дистрибьютор в России:
ООО "НеоТест"

ул. РаSTOPчина, 1Г, г. Владимир
+7 499 911 02 01
info@neo-test.ru
www.neo-test.ru

Техническая поддержка
support@neo-test.ru
+7 499 444 05 50



МУЛЬТИСКРИН® Фумонизин

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Набор реагентов МУЛЬТИСКРИН® Фумонизин предназначен для количественного определения фумонизинов группы В (В1,В2,В3) в зерне, зернобобовых, масличных культурах, продуктах их переработки: мукомольно-крупяных и макаронных изделиях, хлебобулочных и кондитерских изделиях, продукции масложировой промышленности, продуктах для детского питания (каши на молочно-зерновой основе, мука и крупа, требующая варки; каши сухие безмолочные быстрорастворимые; каши сухие молочные, требующие варки, растворимое печенье, консервы, содержащие крупу и муку, хлебобулочные, кулинарные, мучные кондитерские и мукомольно-крупяные изделия), попкорне, пиве и пивном сусле а также в кормах, комбикормах, кормовых добавках растительного происхождения, в зеленых, сочных и грубых кормах в целях ветеринарно-санитарной экспертизы и санитарно-гигиенического контроля методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа.

1.2 Наличие микотоксинов в кормах, продовольственном сырье и продуктах питания вызывает ряд необратимых патологических изменений в организме, представляющих серьёзную угрозу для здоровья человека и животных, и наносит большой экономический ущерб сельскому хозяйству. Во многих странах мира существует обязательная система контроля кормов, пищевого сырья и продуктов питания растительного происхождения на наличие и содержание основных микотоксинов. В странах ЕС это отражено в ряде Регламентов и Директив ЕС, таких как 2002/32/ЕС, ЕЕС №1881/ 2006, 2006/576/ЕС и т.д. В Республике Беларусь эти мероприятия регулируются санитарными нормами и правилами «Требования к продовольственному сырью и пищевым продуктам», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.13г. №52, и гигиеническим нормативом «Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.13г. №52, ТР ТС 021 «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна» и ветеринарно-санитарными правилами обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов, утвержденными Постановлением Минсельхозпрода РБ от 10.02.2011 № 10 в редакции №33 от 20.05.2011.

1.3 Набор рассчитан на проведение анализа 42 исследуемых проб и 6 градуировочных растворов в дубликатах или 90 исследуемой пробы и 6 градуировочных растворов при проведении единичных измерений, всего 96 определений. При необходимости набор может быть разделен на 3-4 независимые части с различным количеством определяемых проб. Для каждой постановки необходимо построение нового градуировочного графика.

Предел измерений фумонизинов группы В определяется нижним значением величины диапазона измерений. Диапазон измерения (0,05 – 5,00) мг/кг. Продолжительность анализа составляет 30-40 мин без учета пробоподготовки.

2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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

Таблица 1 – Состав набора

Компонент	Количество
1 Иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
2 Планшет для смешивания	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
3 Градуировочные растворы С ₀ , С ₁ , С ₂ , С ₃ , С ₄ и С ₅ с условными значениями концентрации фумонизина В ₁ – 0; 0,05; 0,15; 0,45; 1,35; 5,00 мг/кг, готовы к использованию	6 флаконов по 0,9 мл
4 Конъюгат, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
5 Хромоген-субстратный раствор, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
6 Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл
7 Клейкая пленка	1 шт

Примечания

1. Для удобства расчетов результатов анализа сделан перевод истинных концентраций фумонизина В₁ в градуировочных растворах в массовые доли (мг/кг) фумонизинов в образцах путем умножения на коэффициент 50, учитывающий фактор разведения при подготовке пробы из исследуемого сухого образца продукции. Это позволяет находить значение массовой доли фумонизинов группы В в образце непосредственно по градуировочному графику.

2. В состав набора 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.

3. Клейкая пленка используется для хранения иммуносорбента после вскрытия вакуумной упаковки для защиты лунок от попадания в них влаги.

2.2 Принцип работы набора. Определение содержания фумонизинов группы В в наборе МУЛЬТИСКРИН® Фумонизин проводят, используя метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). Фумонизины экстрагируют из размоленного образца раствором метанол:вода = 70:30. В лунки планшета для

предварительного смешивания вносят конъюгат фумонизина В1 с пероксидазой из корней хрена, добавляют градуировочные растворы с известной концентрацией фумонизина В1 или подготовленные к анализу растворы проб и аликвоты полученной смеси переносят в лунки планшетного иммуносорбента. Во время последующей инкубации фумонизин В1 в составе градуировочного раствора или фумонизины группы В подготовленной исследуемой пробе конкурируют с конъюгатом за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок иммуносорбента. После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами микотоксины, добавляют хромоген-субстратную смесь, которая под действием фермента в составе, связанного с антителами конъюгата превращается в окрашенный продукт, количество которого обратно пропорционально содержанию фумонизинов группы В в анализируемом образце или градуировочном растворе. Затем добавляют стоп-реагент, останавливающий ферментативную реакцию и одновременно изменяющий окраску раствора с голубой на желтую. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на многоканальном планшетном фотометре как величину оптической плотности, выраженную в оптических единицах (о.е.), при длине волны 450 нм. На основании значений оптической плотности компьютерная программа строит градуировочный график и автоматически рассчитывает концентрации фумонизинов в исследуемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

3.2 Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с анализируемыми образцами, экстрактами и градуировочными растворами, так как они содержат фумонизин В1, обладающий канцерогенным, мутагенным и тератогенным действием.

Метанол, входящий в состав экстрагирующего раствора, является сильным ядом. Не допускайте его контактов с кожей и глазами. В случае попадания на тело немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды.

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.

3.3 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

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

3.5 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

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

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Реагенты набора, экстракты проб, градуировочные растворы и другие растворы, применяемые в анализе, необходимо отбирать отдельными наконечниками к пипетке.

4.2 Не допускается использование набора после окончания срока годности.

4.3 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из разных серий данного набора или отдельные компоненты из наборов других изготовителей.

4.4 Для приготовления каждого реагента необходимо использовать отдельную стеклянную емкость. Вся используемая для приготовления реагентов стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта хромовой смесью и многократно промыта водопроводной водой и сполоснута дистиллированной водой.

4.5 Необходимо обратить внимание на тщательное, но аккуратное перемешивание содержимого каждого компонента, а также растворов в лунках планшета для смешивания. Во всех случаях следует избегать образования пены.

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

4.7 Во время проведения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности или держать компоненты на ярком свете во время инкубации или хранения.

4.8 Поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор перед использованием должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 При работе с набором следует использовать следующие средства измерений, оборудование и материалы.

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

Весы лабораторные среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 400 г и погрешностью взвешивания 0,1 г.

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

Одноканальные дозаторы переменного объема: (5-50) мкл с погрешностью дозирования не более 5 %, (20-200) мкл с погрешностью дозирования не более 2 %, (100-1000) мкл, (1000-5000) мкл с погрешностью дозирования не более 1,5 % со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

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

Мельница типа «Циклон» (Cyclotec Tecator, Швеция; ЛМТ-1, Россия и др.), снабженная металлическими ситами с отверстиями диаметром 1 мм, обеспечивающая 100 %-ный проход частиц через указанные сита.

Мельница типа МЛЗ или других аналогичных марок по ТНПА, обеспечивающая требуемую крупность размола.

Гомогенизатор или бытовой блендер.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g.

Сита лабораторные для мукомольной промышленности с номинальным размером круглого отверстия в свету или квадратного отверстия сетки 1 мм.

Секундомер или таймер.

Термостат, обеспечивающий температуру (20-25) °С.

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

Воронки стеклянные.

Колбы конические вместимостью 100 мл.

Стаканы вместимостью 100 и 500 мл.

Цилиндры вместимостью 50, 100 и 500 мл.

Пробирки стеклянные вместимостью 15 мл.

Флаконы из пластмассы вместимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой.

Пробирки полипропиленовые вместимостью 5,0 мл.

Пробирки полипропиленовые центрифужные с крышкой (типа Фалкон) вместимостью 15 и 50 мл.

Фильтры обеззоленные «белая лента».

Бумага индикаторная универсальная.

Стеклянные емкости с плотно закрывающимися крышками.

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

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

Штатив для пробирок.

Перчатки резиновые или пластиковые.

5.2 Реактивы, используемые в работе.

Вода дистиллированная или деионизованная.

Кислота соляная х.ч. (плотность 1,19 г/мл, массовая доля HCl 38,3 %).

Метанол ч.д.а.

Натрия гидроокись х.ч.

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

6 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

6.1 Приготовление 20%-го раствора гидроксида натрия (NaOH).

Навеску гидроксида натрия массой $(20,0 \pm 0,1)$ г переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл дистиллированной воды. После растворения доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Готовый раствор хранят в полиэтиленовой, полипропиленовой и резиновой таре при комнатной температуре не более месяца.

6.2 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=70:30 (70%).

В стакан вместимостью 500 мл цилиндром приливают 350 мл метанола и 150 мл дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 5) °С – 3 мес.

6.3 Приготовление хромоген-субстратного раствора (если потребуется)

Хромоген-субстратную смесь готовят в темных стеклянных или пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Раствор хромогена разводят субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1:20, например: 100 мкл – хромогена, 2000 мкл – буферного раствора) из расчета 100 мкл на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 мл вносят необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляют в 20 раз меньшее количество раствора хромогена и интенсивно перемешивают в течение (30-40) с.

Примечание – Субстратный буферный раствор и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.

Приготовленный или поставленный в наборе 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, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники

7 ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

7.1 Отбор проб проводят по СТБ 1036, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 27668, ГОСТ ISO 6497, и другим ТНПА на конкретные виды продукции.

Отобранные пробы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 25 °С в течение 30 суток без доступа влаги. Допускается хранение при температуре минус 18 °С в течение 6 месяцев в условиях, исключающих изменение их влажности. Перед проведением подготовки проб замороженные пробы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 до плюс 8°С.

7.2 Подготовка проб зерновых, зернобобовых, масличных культур и продуктов их переработки, кормов.

Доводят температуру проб, отобранных в соответствии с п. 7.1, до значений 20-25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды.

Пробы зерна, зернобобовых, масличных, макаронных, крупяных изделий, продуктов переработки зерновых (отруби, жмыхи, шроты), кормов размалывают на мельнице типа «Циклон». При отсутствии мельницы такого типа образец размалывают на лабораторной мельнице МЛЗ или мельнице других аналогичных марок, не снабженных ситами. Затем просеивают через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм. Остаток на сите снова измельчают на мельнице марки МЛЗ так, чтобы он весь прошел через сито с отверстиями диаметром 1 мм, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Пробы хлебобулочных изделий, кормовых продуктов пивоваренной промышленности и спиртового производства, мезги, попкорна измельчают с помощью гомогенизатора или бытового блендера, перемешивают. Пробы мукомольных изделий, глютенных тщательно перемешивают

Взвешивают (5,0±0,1) г размолотой пробы. Навеску пробы помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и цилиндром добавляют 25 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода = 70:30. Важно соблюдать соотношение масса образца:объем экстрагирующей смеси = 1:5.

Коническую колбу закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на встряхивателе при 150 об/мин в течение 5-7 мин. Затем дают отстояться раствору в течение 5-10 мин для осаждения частиц и фильтруют в пробирку или колбу через фильтр «белая лента». Контроль pH фильтрата проводят по универсальной индикаторной бумаге, доводя до значения pH 6-8, используя концентрированную соляную кислоту или 20 %-ый раствор гидроксида натрия.

Пробирку или колбу с фильтратом закрывают пробкой, профильтрованный раствор перемешивают и используют для проведения ИФА в течение 2 ч.

7.3 Подготовка проб зеленых, сочных и грубых кормов

Навеску высушенной до постоянной массы исследуемой пробы гомогенизируют с помощью блендера или гомогенизатора, взвешивают (5,0±0,1) г и помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл. Цилиндром добавляют 25 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода=70:30. Важно соблюдать соотношение масса образца : объем экстрагирующей смеси = 1:5. Пробирку закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на ротаторе при 150 об/мин в течение 5-7 мин.

Содержимое в пробирке центрифугируют в течение 10 мин при 4000 g и температуре 20-25 °С. Переносят надосадочную жидкость в пробирку или колбу и проводят контроль рН с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения рН 6-8 с использованием 20 %-го раствора гидроокиси натрия. Полученный раствор перемешивают и используют для проведения ИФА в течение 2 ч.

7.4 Подготовка проб продуктов для детского питания (каши на молочно-зерновой основе, мука и крупа, требующая варки; каши сухие безмолочные быстрорастворимые; каши сухие молочные, требующие варки, растворимое печенье, консервы, содержащие крупу и муку, хлебобулочные, кулинарные, мучные кондитерские и мукомольно-крупяные изделия), попкорна.

Доводят температуру пробы, отобранной в соответствии с п. 7,1, до значений от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая ее при температуре окружающей среды. Пробы муки, сухих каш и консервов тщательно перемешивают. Пробы хлебобулочных, кулинарных, мучных кондитерских изделий и попкорна измельчают с помощью гомогенизатора или бытового блендера и перемешивают.

Взвешивают ($5,0 \pm 0,1$) г размолотой пробы. Навеску исследуемой пробы помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл и цилиндром добавляют 25 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода=70:30. Важно соблюдать соотношение масса пробы : объем экстрагирующей смеси = 1:5. Пробирку закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на ротаторе при 150 об/мин в течение 5-7 мин. Содержимое в пробирке центрифугируют в течение 10 мин при 4000 g и температуре 20-25 °С. Переносят надосадочную жидкость в пробирку или колбу и проводят контроль рН с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения рН 6-8 с использованием концентрированной соляной кислоты или 20 %-го раствора гидроокиси натрия.

Полученный раствор перемешивают и используют для проведения ИФА в течение 2 ч.

7.5 Подготовка проб пива и пивного сусла.

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

Аликвота исследуемого образца пива/сусла должна быть предварительно дегазирована умеренным нагревом при температуре 20-25 °С до исчезновения пузырьков газа. Нефильтрованное пиво/сусло перед дегазированием должно быть предварительно отфильтровано через бумажный фильтр.

В пробирку вместимостью 50 мл отбирают 1 мл пива/сусла, добавляют 49 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают на вортексе. Далее содержимое пробирки доводят до значения рН 6,5-7,5 с использованием 20 %-го раствора гидроокиси натрия и используют для проведения анализа в течение 2 ч.

7.6. Подготовка проб для анализа

Перед проведением анализа полученные экстракты (п.7.2—7.4) разводят водой в десять раз в полипропиленовых пробирках, добавляя к 0,1 мл экстракта 0,9 мл дистиллированной воды, и тщательно перемешивают, избегая образования пены.

Пробирку закрывают пробкой, раствор перемешивают и используют для проведения ИФА.

Пробы пива и пивного сусла анализируют в соответствии с подготовкой по п.7.5

8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

8.1 Перед проведением ИФА компоненты набора выдерживают при комнатной температуре (20-25) °С в течение 60 мин. Перед использованием жидкие реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием, избегая образования пены.

8.2 Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и экстрактов исследуемых образцов в микропланшетах согласно таблице 2, с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и раствора пробы требуется две лунки (при исследовании проб в дубликатах).

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

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₀	C ₀	П ₃	П ₃	П ₁₁	П ₁₁						
B	C ₁	C ₁	П ₄	П ₄	П ₁₂	П ₁₂						
C	C ₂	C ₂	П ₅	П ₅	П ₁₃	П ₁₃						
D	C ₃	C ₃	П ₆	П ₆	П ₁₄	П ₁₄						
E	C ₄	C ₄	П ₇	П ₇	П ₁₅	П ₁₅						
F	C ₅	C ₅	П ₈	П ₈	П ₁₆	П ₁₆						
G	П ₁	П ₁	П ₉	П ₉	П ₁₇	П ₁₇						
H	П ₂	П ₂	П ₁₀	П ₁₀	П ₁₈	П ₁₈						

Примечания:

1. C₀ – C₅ – градуировочные растворы в лунках A-F стрипа №1, и A-F стрипа №2, П₁ – П₁₈ – растворы проб в лунках G-H стрипов №1 и №2 и в лунках A-H стрипов №3-6.

2. Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальную пипетку.

3. Не следует использовать более 6 стрипов в одной группе исследований.

8.3 Подготовка иммуносорбента

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

8.4 Планшет для смешивания конъюгата и проб освобождают от упаковочного пакета. Необходимое количество стрипов, равное количеству стрипов иммуносорбента, устанавливают в рамку. Схема маркировки этих стрипов аналогична схеме маркировки иммуносорбента. Неиспользованные стрипы помещают в пакет и хранят при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности набора.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выполняют ИФА согласно приведенной в таблице 3 схеме и описаниям этапов.

9.1 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят конъюгат в объеме из расчета 1 мл на стрип. Затем восьмиканальным дозатором в лунки планшета для смешивания вносят по 0,1 мл конъюгата (возможно использование одноканального дозатора). В лунки планшета для смешивания в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 0,1 мл градуировочных растворов в порядке возрастания их концентрации и растворов исследуемых проб, приготовленных в соответствии с п.7.5 или п. 7.6

При проведении одного единичного измерения для градуировочных растворов и растворов проб в лунки вносят по одной аликвоте этих растворов способом, описанным выше.

9.2 Используя восьмиканальную пипетку с новыми наконечниками, аккуратно перемешивают содержимое лунок стрипа путем пипетирования раствора вверх и вниз 3-4 раза, не допуская образования пены, и немедленно переносят по 0,1 мл полученной смеси в соответствующие лунки иммуносорбента.

Примечание – Временной интервал от начала перемешивания до начала инкубирования – не более 3 мин.

9.3 Иммуносорбент заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при комнатной температуре (20-25) °С в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света.

9.4 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем с помощью восьмиканальной пипетки проводят 4-кратное промывание планшета деионизованной или дистиллированной водой порциями по 0,2 мл на одно промывание каждой лунки, при этом воду предварительно вносят в чистую кювету в требуемом объеме из расчета 6,5 мл на один стрип.

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

9.5 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят хромоген-субстратный раствор из расчета 1 мл на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 0,1 мл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения не должно превышать 2 мин. Закрывают планшет изолирующим листком или крышкой и инкубируют в течение 5 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре (20-25) °С.

9.6 Останавливают ферментативную реакцию путем добавления во все лунки планшета по 0,1 мл стоп-реагента, предварительно внесенного в чашку Петри или пластмассовую кювету из расчета 1 мл на стрип. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 Через 5 мин после внесения стоп-реагента, но не позднее 15 мин, измеряют в планшетном спектрофотометре оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм.

10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Для построения градуировочного графика и расчета концентрации фумонизинов группы В в анализируемых пробах используют файл для расчетов Microsoft Excel, предоставляемый по запросу, или программное обеспечение стороннего производителя (например, встроенное программное обеспечение микропланшетного фотометра), после внесения необходимых параметров данного ИФА. В расчетную программу введены условные значения концентраций фумонизина В1 в градуировочных растворах в терминах массовых концентраций (мг/кг) с учетом установленного фактора разведения при пробоподготовке.

10.2 На основании внесенных оператором в таблицу раздела 1 файла для расчетов Microsoft Excel оптических плотностей градуировочных растворов, строится градуировочный график зависимости $\text{logit } B_i/B_0$ (ось ординат) от концентрации C_i (ось абсцисс), где:

$$\text{logit } B_i/B_0 = \lg (B_i/B_0 / 1 - B_i/B_0),$$

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

B_0 – значение оптической плотности для градуировочного раствора C_0 , о.е, (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

C_i – концентрация фумонизина B_1 в градуировочном растворе, мг/кг.

Программа автоматически рассчитает по градуировочному графику концентрацию фумонизинов в исследуемых пробах в мг/кг после внесения оператором значений оптической плотности в о.е, в соответствующие графы таблицы раздела 2 файла для расчетов.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение $\overline{C_p}$ результатов измерений двух параллельных проб одного образца.

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

Полученный результат округляют до второго знака после запятой.

10.3 Интерпретация результатов

В случае, когда массовая концентрация фумонизинов группы В в растворе пробы превышает максимальное значение массовой концентрации фумонизина B_1 в градуировочном растворе C_5 , то есть, когда результат измерений оптической плотности раствора пробы менее оптической плотности градуировочного раствора с массовой концентрацией 5,00 мг/кг, проводят разбавление подготовленного раствора пробы, используя для разбавления дистиллированную воду. Полученный результат измерений умножают на кратность разбавления.

11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАБОРА

11.1 Параметры ИФА для градуировочных растворов –: связывание конъюгата фумонизина B_1 с пероксидазой: B_0 – от 1,3 до 2,7 о.е; B_1/B_0 – не более 95 %, B_4/B_0 – не более 35 %.

11.2 Чувствительность – минимальная концентрация фумонизина B_1 в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью набора, не превышает 0,05 мг/кг.

11.3 Специфичность. В наборе МУЛЬТИСКРИН® Фумонизин при изготовлении иммуносорбента используется высокоспецифичное антитело, проявляющее кросс-реактивность к фумонизину B_1 , равную 100 %, к фумонизину B_2 – 70%, к фумонизину B_3 – 100 %, что позволяет определять фумонизины группы В.

11.4 Диапазон измерений составляет от 0,05 до 5,00 мг/кг.

11.5 Извлечение (открытие) добавки фумонизина B_1 в холостом образце продукта – не менее 75 %.

11.6 Повторяемость (коэффициент вариации) результатов определения фумонизинов группы В в контрольных пробах различных видов продуктов в одной постановке ИФА не превышает 15 %.

11.7 Воспроизводимость (коэффициент вариации) результатов определения фумонизинов группы В в контрольных пробах различных видов продуктов в нескольких постановках ИФА в нескольких лабораториях не превышает 25 %.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА


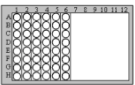
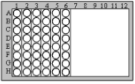


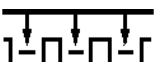


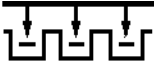
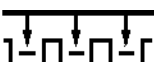

12.1 Набор хранят в упаковке изготовителя при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности, не допуская замораживания.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев от даты изготовления.

13 ОБЗОР ВЕРСИЙ

Номер версии	Описание изменений
1.0	-
2.0	п. 5.1 – внесено дополнительное оборудование п. 7 – изменено название п. 7.3 – добавлена пробоподготовка для зеленых, сочных и грубых кормов п. 7.4 – добавлена пробоподготовка для детского питания п. 7.5 – добавлена пробоподготовка для пива
2.1	Внесены изменения в п. 2.1 – в состав набора добавлена клейкая пленка
2.2	Обновлён п. 6.1

Таблица 3 – Схема анализа

Разведение экстрактов анализируемых продуктов		Смешать 0,1 мл экстракта и 0,9 мл дистиллированной воды. Для проб пива см. п. 7.5
Подготовка иммуносорбента		Вставить необходимое количество стрипов с иммобилизованными антителами
Подготовка планшета для смешивания		Вставить необходимое количество стрипов
<i>Планшет для смешивания</i>		
Внесение конъюгата		Добавить по 0,1 мл конъюгата в каждую лунку
Внесение градуировочных растворов и растворов анализируемых проб		Добавить по 0,1 мл градуировочных растворов и разведенных экстрактов в соответствующие лунки
<i>Иммуносорбент</i>		
Перенесение содержимого из планшета для смешивания в иммуносорбент		Перенести по 0,1 мл перемешанных проб из планшета для смешивания в соответствующие лунки иммуносорбента
Инкубация		Выдержать при температуре (20-25) °С в темноте в течение 15 мин
Промывание		Промыть 4 раза дистиллированной или деионизованной водой по 0,2 мл на каждую лунку
Внесение хромоген-субстратного раствора		Добавить по 0,1 мл в каждую лунку и выдержать 5 мин в темноте при температуре (20-25) °С
Внесение стоп-реактента		Добавить по 0,1 мл в каждую лунку
Измерение оптической плотности		Измерить на микропланшетном фотометре, длина волны 450 нм