

ПЕНИЦИЛЛИН ИФА

5091PEN [5]02.24

Иммуноферментный метод для скрининга и количественного
определения пенициллина в различных матрицах

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**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



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси: 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



КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Тест-набор для ИФА пенициллина это конкурентный иммуноферментный анализ для количественного анализа пенициллина в различных матрицах. Основой тест-набора являются антитела к пенициллину. ИФА-набор содержит микротитровальный планшет на 96 лунок и все реагенты, необходимые для проведения анализа, в т.ч. градуировочные растворы. В инструкции описаны способы быстрой и качественной экстракции пенициллинов из различных матриц.

1. ВВЕДЕНИЕ

Пенициллины широко используются в ветеринарии, составляя наиболее значимую группу антибиотиков. Пенициллины являются сильнодействующими ингибиторами бактериального роста, обладают низкой токсичностью, минимальными побочными эффектами и быстро выводятся из организма.

Для защиты потребителя и безопасности молочной продукции Комитет по ветеринарной медицине рекомендовал предельно допустимые концентрации 6 видов пенициллинов. Положение комиссии (ЕС) № 37/2010 (1).

2. ПРИНЦИПЫ ИФА ПЕНИЦИЛЛИНА

Тест-набор для проведения ИФА включает 12 стрипов по 8 лунок. Антитела, ампициллин, маркированный пероксидазой хрена, градуировочные растворы либо растворы проб вносятся в лунки планшета. Свободный пенициллин, присутствующий в пробе либо градуировочном растворе, и ферментно маркированный ампициллин конкурируют за центры связывания антител (конкурентный ИФА).

После инкубации в течение 1 часа несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки. Количество связанного ферментно маркированного ампициллина визуализируется внесением смеси субстрат/хромоген (H_2O_2 / тетраметилбензидин). Связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в окрашенный продукт.

Реакция окрашивания останавливается внесением серной кислоты. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм, она обратно пропорциональна концентрации пенициллина в пробе.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного тест-набора ИФА используются специфические антитела, полученные с помощью пенициллина, конъюгированного белком. Реакция, имитирующая контроль антител в буфере, составляет:

| Антибиотик | Перекрестная чувствительность, % |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Ампициллин | 100 |
| Бензилпенициллин (пенициллин G) | 100 |
| Азлоциллин | 99 |
| Пиперациллин | 88 |
| Амоксициллин | 85 |
| Пенициллин V | 58 |
| Оксациллин | 40 |
| Клоксациллин | 30 |
| Диклоксациллин | 15 |
| Нафциллин | 3 |

Предел обнаружения (LOD) рассчитывается по формуле: $X_n + 3SD$ и определяется при оптимальных условиях.

| Виды продукции | Вариант пробоподготовки | Предел обнаружения мкг/кг (ppb) |
|---------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Молоко | 8.1 | 0,08 |
| Сухое молоко | 8.2 | 1,52 |
| Масло | 8.3 | 0,43 |
| Рыба (в том числе лосось) | 8.4 | 2,03 |
| Креветки | 8.5 | 5,00 |
| Мясо цыпленка | 8.6 | 5,00 |
| Мясо индейки | 8.7 | 0,89 |
| Говядина | 8.8 | 3,25 |
| Свинина | 8.8 | 1,71 |
| Йогурт и похожие продукты | 8.9 | 1,5 |
| Сливки | 8.9 | 0,39 |
| Молодой сыр | 8.9 | 0,63 |
| Творог | 8.9 | 0,94 |
| Сыр зрелый | 8.10 | 1,23 |

Диапазон измерений метода в соответствии с МВИ.МН 5336-2015

| Виды продукции | Диапазон измерений, мкг/кг (ppb) |
|---|----------------------------------|
| Мясо | 2,5 – 160,0 |
| Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молоко сухое восстановленное | 0,16 – 8,00 |
| Молоко сгущенное | 1,00 – 32,00 |
| Творог, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, коктейли молочные, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), мороженое на молочной основе, сыворотка молочная, сыворотка восстановленная молочная | 2,50 – 160,0 |

Примечание: Нижняя граница диапазона измерений совпадает с пределом измерений.

4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

- Набор реагентов должен храниться при температуре от +2°C до +8°C в темном месте. Не замораживать.

- После истечения срока годности невозможно гарантировать приемлемое качество.

- Перед проведением анализа все компоненты тест-набора, включая микротитровальный планшет, должны быть доведены до комнатной температуры.

- Следует избегать появления конденсата в лунках планшета. Планшет должен быть согрет до температуры окружающей среды перед вскрытием упаковки.

- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор хромогена.

Следующие показатели могут являться признаком порчи реагентов:

- Голубая окраска раствора хромогена перед внесением в лунки

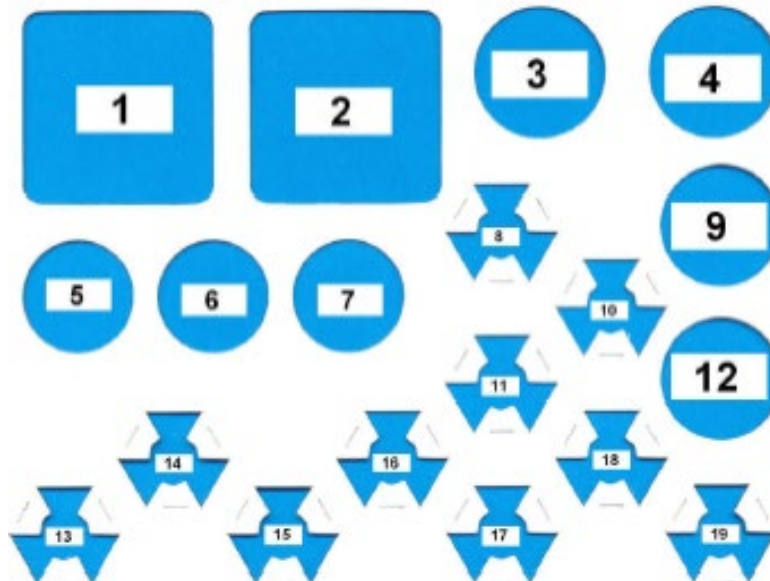
- Слабая либо отсутствующая реакция окрашивания нулевого градуировочного раствора (E450нм <0,8)

5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок), сенсibilизированный антителами. Планшет готов к использованию.

Позиции реагентов в наборе. Для приготовления реагентов смотрите раздел 9.



1. Буфер для разведения (25 мл, концентрации 4x)
2. Буфер для промывки планшета (30 мл, концентрации 20x)
3. Раствор субстрата (12 мл, готов для применения)
4. Стоп-реагент (15 мл, готов для применения)
5. Стандарт (4 нг/мл, лиофилизированный ампициллин)
6. Стандарт (4 нг/мл, лиофилизированный ампициллин)
7. Стандарт (4 нг/мл, лиофилизированный ампициллин)
8. Конъюгат (100 мкл, концентрации 100x)
9. не используется
10. Антитела (100 мкл, концентрации 100x)
11. не используется
12. не используется
13. не используется
14. не используется
15. не используется
16. не используется
17. не используется
18. не используется
19. не используется

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- весы
- перчатки

- гомогенизатор (вортекс, миксер)
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100-300 мкл
- шейкер для микротитровальных планшетов (или ротатор)
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм
- пипет-дозаторы
- степпер
- дистиллированная вода
- дихлорметан (необходим для пробоподготовки по МВИ.МН 5336-2015)
- центрифуга
- стаканы химические, мерные колбы 100 или 150 мл
- пробирки для центрифугирования, 15 мл
- пробирки для центрифугирования 2 мл

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Стоп-реагент содержит серную кислоту концентрации 0,5 М. Не допускать контакта реагента с кожей.
- Избегать контакта проб с кожей и слизистыми.
- Не пипетировать ртом.
- Не допускается есть, пить, курить, хранить или готовить пищу или применять косметику в пределах обозначенной рабочей области.
- Тетраметилбензидин является токсичным при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании. Поэтому будьте внимательны при работе с субстратом.
- Не используйте компоненты тест-набора после истечения их срока годности и не перемешивайте компоненты из разных партий.
- Каждая лунка используется как оптическая кювета. Поэтому не прикасайтесь к поверхности лунок, не допускайте их повреждения и загрязнения.
- Все компоненты должны быть полностью растворены перед применением. Обращайте особое внимание на субстрат, который имеет тенденцию к кристаллизации при температуре +4°C.
- Оптимальные результаты могут быть получены при строгом соблюдении протокола анализа. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования и равномерного промывания лунок.

8. ПОДГОТОВКА ПРОБ

Тест-набор может быть использован для определения пенициллина в различных матрицах. Мы представили Вам информацию о различных вариантах пробоподготовки, но возможно также использование альтернативных методов.

8.1 Молоко

- Перемешать пробу молока на вортексе в течение 3 секунд
- Развести 250 мкл молока с 250 мкл рабочего раствора буфера для разведения
- Перемешать на вортексе в течение 3 секунд
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.2 Сухое молоко

- Взвесить 1 г молока и довести до 10 мл деионизированной водой
- Перемешивать пробу на вортексе до полного растворения
- Развести образец 1:2 рабочим раствором буфера для разведения (например, 1 мл образца + 1 мл рабочего раствора буфер для разведения)

- Перемешать на вортексе в течение 3 секунд
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.3 Масло

- Взвесить 5 г масла в 50 мл пробирке
- Добавить 20 мл деионизированной воды и инкубировать при 40°C на водяной бане до полного растворения масла
- Гомогенизировать пробу на вортексе
- Центрифугировать 10 мин при 4000g (4°C)
- Развести водную фазу образца 1:4 рабочим раствором буфера для разведения (например, 0,5 мл образца нижней водной фазы + 1,5мл рабочего раствора буфера для разведения)
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.4 Рыба (в том числе лосось)

- Гомогенизировать пробу
- Добавить 4 мл деионизированной воды к 1 г гомогенизированного образца
- Перемешать пробу на вортексе и встряхивать в течение 15 минут
- Центрифугировать 10 мин при 2000g (20-25°C)
- Развести супернатант образца 1:8 рабочим раствором буфера для разведения (например, 50 мкл супернатанта + 350 мкл рабочего раствора буфера для разведения)
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.5 Креветки

- Гомогенизировать пробу
- Добавить 4 мл деионизированной воды к 1 г гомогенизированного образца
- Перемешать пробу на вортексе и встряхивать в течение 15 минут
- Центрифугировать 10 мин при 2000g (20-25°C)
- Развести супернатант образца 1:8 рабочим раствором буфера для разведения (например, 50 мкл супернатанта + 350 мкл рабочего раствора буфера для разведения)
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.6 Мясо цыпленка

- Гомогенизировать пробу
- К 1 г гомогенизированной пробы добавить 4 мл дистиллированной воды
- Перемешать пробу на вортексе и встряхивать в течение 15 минут
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 2000g / 20-25°C
- Развести супернатант образца 1:8 рабочим раствором буфера для разведения (например, 50 мкл супернатанта + 350 мкл рабочего раствора буфера для разведения)
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.7 Мясо индейки

- Гомогенизировать пробу
- К 1 г гомогенизированной пробы добавить 4 мл дистиллированной воды
- Перемешать пробу на вортексе и встряхивать в течение 15 минут
- Развести супернатант образца 1:8 рабочим раствором буфера для разведения (например, 50 мкл супернатанта + 350 мкл рабочего раствора буфера для разведения)
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.8 Мясо говядина, свинина

- Гомогенизировать пробу
- К 1 г гомогенизированной пробы добавить 4 мл дистиллированной воды
- Перемешать пробу на вортексе и встряхивать в течение 15 минут
- Центрифугировать пробу 10 мин при 2000 g при комнатной температуре (20 – 25 °С)
- Развести супернатант образца 1:8 рабочим раствором буфера для разведения (например, 50 мкл супернатанта + 350 мкл рабочего раствора буфера для разведения)
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.9 Йогурт и похожие продукты, сливки, молодой сыр, творог

- К 5 г пробы добавить 20 мл дистиллированной воды
- Полностью гомогенизировать пробу на вортексе
- Центрифугировать пробу 10 мин при 4000 g при 4°С
- Развести нижнюю жидкую фазу пробы 1:4 рабочим раствором буфера для разведения (например, 0,5 мл нижней фазы + 1,5 мл рабочего раствора буфера для разведения)
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.10 Сыр зрелый

- К 1 г пробы добавить 4 мл дистиллированной воды и 2 мл гексана
- Полностью гомогенизировать пробу на вортексе, встряхивать переверачиванием 15 мин
- Центрифугировать пробу 10 мин при 4000 g при 4°С
- Развести нижнюю жидкую фазу пробы 1:4 рабочим раствором буфера для разведения (например, 0,5 мл нижней фазы + 1,5 мл рабочего раствора буфера для разведения)
- В тесте используют 50 мкл на лунку

8.11. Сухая сыворотка

- разведите образец 1:10 буфером для образцов (например, 1 г образца в 10 мл буфера для образцов);
- перемешайте на вортексе в течение 3 с;
- используйте 50 мкл раствора в ИФА.

8.12. Сливки

- добавьте 20 мл деионизированной воды к 5 г образца сливок, гомогенизируйте образец на вортексе;
- центрифугируйте образец в течение 10 мин при 4000 g и 4 °С;
- разведите нижнюю водную фазу 1:4 буфером для образцов (например, 0.5 мл нижней фазы + 1.5 мл буфера для образцов)
- используйте 50 мкл раствора в ИФА.

Подготовка проб в соответствии с МВИ.МН 5336-2015

Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Предварительно доведите температуру образца до 20 – 25 °С. Отбирают дозатором две параллельные пробы молока, объемом по 250 мкл и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. К пробам в пробирках добавляют отобранные дозатором 250 мкл рабочего раствора буфера для разведения, и тщательно перемешивают на вортексе. После перемешивания раствор используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре 20 – 25 °С в течение одного часа. Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

Подготовка проб сухого молока

Доводят температуру образца до 20 – 25 °С.

В стаканы вместимостью 100 мл или 150 мл помещают 2 параллельные навески образца сухого молока, взвешенные с точностью до 0,1 г. Масса навесок в зависимости от содержания жира составляет:

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;
- 10,0 г сухого молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше.

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

Отбирают дозатором пробы молока, объемом 250 мкл и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. К пробам в пробирках добавляют отобранные дозатором 250 мкл рабочего раствора буфера для разведения и тщательно перемешивают на вортексе. После перемешивания растворы используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре 20 – 25 °С в течение одного часа. Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

Подготовка проб творога, коктейлей молочных, кисломолочных продуктов, сыра, масла сливочного, мороженого на молочной основе

Образцы масла сливочного, охлажденные до температуры не выше минус 10 °С измельчают с помощью терки, перемешивают и доводят температуру до 20 – 25 °С. Для остальных образцов доводят температуру до 20 – 25 °С, гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера (жидкие образцы тщательно перемешивают).

От гомогенизированного образца отбирают 2 навески массой 0,50 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл и добавляют в каждую пробирку отмеренные дозатором 3,5 мл дистиллированной воды и отмеренные пипеткой 4,0 мл дихлорметана. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вортексе, а затем при переворачивании на ротаторе в течение 15 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 2000 g, 10 мин.

После центрифугирования из пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 50 мкл и переносят ее в пробирку для центрифугирования вместимостью 2 мл. В пробирку добавляют отмеренные дозатором 200 мкл рабочего раствора буфера для разведения и тщательно перемешивают на вортексе. Полученный раствор проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре 20 – 25 °С в течение одного часа. Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают

Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки

Восстановление сухой молочной сыворотки. Доводят температуру образца до 20 – 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. В стаканы вместимостью 100 мл или 150 мл помещают 2 навески образца массой 12,5 г, взвешенные с точностью до 0,1 г. Затем приливают небольшими

порциями по 10 – 20 мл дистиллированную воду, нагретую до температуры $(40 \pm 5) ^\circ\text{C}$, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения навесок растворы из стакана количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

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

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

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от 20 до 25 °С в течение одного часа. Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа.

Подготовка проб сгущенного молока

Доводят температуру образца до 20 – 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают. В стаканы вместимостью 100 мл или 150 мл помещают 2 параллельные навески образца массой 25,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5 – 10 мл приливают дистиллированную воду, нагретую до температуры 30 °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения образца содержимое стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Отбирают дозатором пробу объемом 250 мкл и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. К пробе в пробирке добавляют отобранные дозатором 250 мкл рабочего раствора буфера для разведения и тщательно перемешивают на вертексе. После тщательного перемешивания полученного раствора в пробирках на вертексе, его используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа. Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа.

Подготовка проб мяса

Доводят температуру образца до 20 – 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 мл и в каждую пробирку добавляют 4,0 мл дистиллированной воды. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вертексе, а затем при переворачивании на ротаторе в течение 15 мин после чего центрифугируют в следующем режиме: 2000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 50 мкл и переносят ее в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 мл. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 350 мкл рабочего раствора буфера для разведения и тщательно перемешивают на вертексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа. Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (20 - 25°C). Неиспользуемые реагенты должны быть немедленно помещены в оригинальную упаковку на хранение при +2°C—+8°C.

Микротитровальный планшет

Не требуемые стрипы должны храниться с осушителем в плотно закрытом оригинальном пакете при температуре 2 - 8 °C.

Буфер для разведения

Буфер для разведения используется для разведения конъюгата, антител и проб. Буфер для разведения поставляется в концентрации 4х. Буфер разводят в пропорции 1:4 (10 мл буфера и 30 мл дистиллированной воды) перед использованием. Перед разведением буфер необходимо довести до комнатной температуры (20-25°C) и тщательно перемешать. Концентрат буфера может кристаллизоваться при температуре +4°C, поэтому его необходимо тщательно перемешать перед разведением дистиллированной водой. Разведенный буфер (рабочий раствор буфера) может храниться в холодильнике (+2°C - +8°C).

Стандарт (3х4 нг/мл)

Подготовьте ряд градуировочных растворов ампициллина. Для этого добавьте 2 мл буфера для разведения к концентрату стандарта и перемешайте. Концентрация полученного раствора составляет 4 нг ампициллина на мл. Внесите 0,25 мл полученного раствора в чистую пробирку и добавьте 0,25 мл буфера для разведения. Продолжайте разведение для получения ряда градуировочных растворов концентрации 4.0, 2.0, 1.0, 0,5, 0.25 и 0,125 нг/мл.

Для длительного хранения: заморозьте аликвоты и храните при -20°C.

Для приготовления новых градуировочных растворов в наборе поставляются 3 виалы концентрата ампициллина.

Конъюгат

Конъюгат поставляется в концентрированном виде (100х). Центрифугированием (в течение 1 минуты при 1000g) обеспечивают стекание концентрата на дно виалы. Концентрат разводят буфером для разведения (напр. 5 мкл концентрата конъюгата + 495 мкл буфера для разведения). На 2 стрипа по 8 лунок требуется 400 мкл раствора конъюгата. Не требуемый концентрат конъюгата должен сразу же быть помещен в темное холодное место (+2°C - +8°C).

Антитела к пенициллину

Антитела к пенициллину поставляются в концентрированном виде (100х). Центрифугированием (в течение 1 минуты при 1000g) обеспечивают стекание концентрата на дно виалы. Концентрат разводят буфером для разведения (напр. 5 мкл концентрата антител + 495 мкл буфера для разведения). На 2 стрипа по 8 лунок требуется 400 мкл раствора антител. Не требуемый концентрат антител должен сразу же быть помещен в темное холодное место (+2°C - +8°C).

Буфер для промывки

Буфер для промывки поставляется в концентрации 20х. Буфер необходимо приготовить непосредственно перед использованием. На один стрип необходимо 40 мл разведенного раствора (2 мл концентрата буфера + 38 мл дистиллированной воды).

Раствор субстрата/хромогена

Раствор субстрата/хромогена (готовый к применению) осаждается при температуре +4°C. Бутылочку с ним необходимо довести до комнатной температуры (в темноте) и перемешать содержимое перед внесением в лунки.

10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Протокол промывки

При ИФА между каждым этапом иммунологической инкубации должны удаляться несвязанные компоненты. Это достигается посредством соответствующей процедуры промывки. Очевидно, что каждая процедура промывания должна проводиться с большой тщательностью для гарантирования хороших результатов повторяемости и воспроизводимости.

В принципе, промывка вручную или с помощью автоматического вошера может осуществляться следующим образом:

Промывка вручную

1. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

2. Все лунки заполняют буфером для промывания до края лунки (300 мкл).

3. Этот процесс промывки (этапы 1 и 2) повторяют трижды.

4. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета

5. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

6. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

Промывание с помощью автоматического вошера

При использовании автоматического вошера проверьте, чтобы из всех лунок жидкость удалялась полностью, чтобы раствор для промывания тщательно распределялся, заполняя до края каждую лунку во время каждого цикла промывания. Вошер должен быть запрограммирован на выполнение трех циклов промывки.

Протокол анализа

1. Подготовьте пробы в соответствии с разделом 8 (Подготовка проб) и подготовьте реагенты в соответствии с разделом 9 (Подготовка реагентов).

2. Вносят 100 мкл раствора для разбавления в двух повторностях (лунки H1, H2)

Вносят 50 мкл буфера для разведения (нулевой градуировочный раствор, макс. опт. плотность) в двух повторностях (лунки A1, A2).

Вносят 50 мкл каждого градуировочного раствора в двух повторностях (лунки от B1,2 до G1,2, т.е. 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 и 4.0 нг/мл).

3. В оставшиеся лунки вносят по 50 мкл каждой пробы в двух повторностях

4. Вносят по 25 мкл конъюгата во все лунки за исключением H1 и H2.

5. Вносят по 25 мкл раствора антител во все лунки за исключением H1 и H2.

6. Планшет запечатывают и перемешивают в течение нескольких секунд его содержимое (на шейкере для микротитровальных планшетов либо аккуратными круговыми движениями).

7. Планшет инкубируют в течение 1 часа в темноте при температуре 4°C.

8. Удаляют раствор из микротитровального планшета и промывают 3 раза буфером для промывания.

9. Вносят по 100 мкл раствора субстрата во все лунки.

10. Тщательно перемешивают и инкубируют планшет в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре (20 – 25°C).

11. Вносят по 100 мкл стоп-реагента во все лунки.

12. Сразу же измеряют оптическую плотность при 450 нм.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значения ОП образцов, измеренные в этом анализ, преобразуются в соответствующие концентрации следующим образом:

Среднее значение оптической плотности (ОП) холостых лунок вычитается из индивидуальной ОП. лунок, содержащих стандарты и образцы. Тогда эти значения ОП стандартов и образцов (средние значения дубликатов) делятся на среднее значение ОП нулевого стандарта и умножается на 100. Таким образом, нулевой стандарт становится равным 100% (максимальное поглощение), а остальная ОП. значения указаны в процентах от максимального поглощения.

Значения, рассчитанные для стандартов, вводятся в полулогарифмический график зависимости концентрации аналита.

Альтернатива калибровочной кривой:

Значения абсорбции (logit) расчета стандартов отложены на оси Y в зависимости от эквивалентной концентрации аналита на логарифмической оси X.

Для удобства клиентов R-Biopharm предлагает 2 программы, которые можно использовать для интерпретации результатов ИФА:

- RIDASOFT®Win.NET Food & Feed (артикул Z9996FF). В этой программе все тесты R-Biopharm ELISA (включая EuroProxima) предварительно запрограммированы в базе данных. Список совместимых ридеров предоставляется по запросу.

- Simplefit. Эта программа на базе Excel разработана для расчета результатов всех тестов EuroProxima.

| Пункт | Продукт | Коэффициент |
|---|---|-------------|
| 8.1 | Молоко | 2 |
| 8.2 | Сухое молоко | 20 |
| 8.3 | Масло | 20 |
| 8.4 | Лосось | 40 |
| 8.5 | Креветки | 40 |
| 8.6 | Мясо цыпленка | 40 |
| 8.7 | Мясо индейки | 40 |
| 8.8 | Говядина, свинина | 40 |
| 8.9 | Йогурт и похожие продукты, сливки, молодой сыр, творог | 20 |
| 8.10 | Сыр твердый | 20 |
| 8.11. | Сыворотка сухая | 10 |
| 8.12. | Сливки | 20 |
| Фактор разбавления при проведении подготовки проб в соответствии с МВИ.МН 5336 | | |
| | Мясо | 40 |
| | Молоко сгущенное | 8 |
| | Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молоко сухое восстановленное | 2 |
| | Творог, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, коктейли молочные, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), мороженое на молочной основе, сыворотка молочная, сыворотка восстановленная молочная | 40 |

12. ЛИТЕРАТУРА

Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.

13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для заказа тест-системы используйте артикул 5091PEN.

14. ИСТОРИЯ ИЗМЕНЕНИЙ

Обновлен п. 11.