



МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин В1

Набор реагентов для определения афлатоксина В1 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. 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



МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин В1

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Набор реагентов МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин В1 предназначен для количественного определения содержания афлатоксина В1 в зерне, зернобобовых и масличных культурах, продуктах их переработки: мукомольно-крупяных, макаронных и хлебобулочных изделиях, продукции масложировой промышленности, орехах, растительных маслах, а также кормах, комбикормах и кормовых добавках растительного происхождения, в зеленых, сочных и грубых кормах; в сушеных рыбе и мясе 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, представляя серьезную угрозу для здоровья человека и животных, и приносит большой экономический ущерб в сельском хозяйстве. Во многих странах мира существует обязательная система контроля кормов, пищевого сырья и продуктов питания растительного происхождения на наличие и содержание основных микотоксинов. В частности, 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 43 исследуемых проб и 5 градуировочных растворов в дубликатах или 91 исследуемой пробы и 5 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 афлатоксина В1 определяется нижним значением величины диапазона измерений. Диапазон измерения (1,5 – 40,0) мкг/кг. Диапазон измерения для кормов и продукции комбикормовой промышленности; зеленых, сочных и грубых кормов (2,0 – 40,0) мкг/кг. Продолжительность анализа составляет 40-50 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 и С ₄ с условными значениями концентрации афлатоксина В ₁ 0; 1,0; 3,0; 10,0; 40,0 мкг/кг, готовы к использованию	5 флаконов по 0,7 мл
4 Конъюгат, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
5 Промывочный раствор, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл
6 Хромоген-субстратный раствор, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
7 Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл
8 Клейкая пленка	1 штука

Примечания

1. Для удобства расчетов результатов анализа сделан перевод истинных концентраций афлатоксина В₁ в градуировочных растворах в массовые концентрации (мкг/кг) афлатоксина В₁ в образцах путем умножения на коэффициент 10, учитывающий фактор разведения при подготовке пробы из исследуемого сухого образца продукции. Это позволяет находить значение массовой доли афлатоксина В₁ 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. В наборе МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин В₁ использован метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее – ИФА). Афлатоксин В₁ экстрагируют из размолотого образца раствором метанол:вода = 70:30. В лунки планшета для предварительного смешивания вносят конъюгат афлатоксина В₁ с пероксидазой из корней хрена, добавляют градуировочные растворы с известной концентрацией афлатоксина В₁ или подготовленные к анализу растворы проб и аликвоты полученной смеси переносят в лунки планшетного иммуносорбента. Во время последующей инкубации афлатоксин В₁ в

составе градуировочного раствора или анализируемой пробы конкурирует 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-субстратный раствор, который под действием пероксидазы превращается в окрашенный продукт. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации афлатоксина В1 в анализируемом образце или градуировочном растворе, т.е. чем больше содержится афлатоксина В1, тем меньше конъюгата связывается с антителами на твердой фазе. 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 массовую долю афлатоксина В1 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 стандартами для градуировки, так как они содержат афлатоксин В1, обладающий канцерогенным, мутагенным, тератогенным эффектами.

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 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 используют 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 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 должна использоваться отдельная стеклянная 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 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 не более 0,1 г.

Восьмиканальный дозатор переменного объема (50-300) 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 с погрешностью дозирования не более 1,5% со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

Водяная баня, обеспечивающая температуру нагрева (37 – 55) °С.

Система для сухого выпаривания проб в токе азота или роторный испаритель (подготовка проб орехов с высоким содержанием масел).

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 1мм, обеспечивающая 100%-ный проход частиц через указанные сита.

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

Гомогенизатор лабораторный или бытовой блендер.

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

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g и охлаждение до плюс 10 °С (охлаждение необходимо только при работе с растительными маслами).

Секундомер или таймер.

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры (20-25)°С.

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

Воронки стеклянные.

Колбы конические стеклянные вместимостью 100 мл.

Стаканы стеклянные вместимостью 100 и 500 мл.

Цилиндры стеклянные вместимостью 50, 100 и 500 мл.

Пробирки стеклянные или полипропиленовые с пробкой вместимостью 5 мл.

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

Стеклянные или пластмассовые флаконы с завинчивающейся крышкой вместимостью 20 или 40 мл.

Фильтры обеззоленные «белая лента».

Бумага индикаторная универсальная.

Стеклянные или полиэтиленовые емкости с плотно закрывающимися крышками.

Пастеровские пипетки.

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.

Натрий хлористый х.ч.

Гексан х.ч. (подготовка проб орехов, растительных масел, сухого мяса и рыбы).

Метилен хлористый х.ч. (подготовка проб орехов с высоким содержанием масел).

Азот газообразный (подготовка проб орехов с высоким содержанием масел).

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 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ – 3 мес.

6.3 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=35:65 (35%).

В стакан вместимостью 100 мл цилиндром приливают 35 мл метанола и 65 мл дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ – 3 мес.

6.4 Приготовление рабочего промывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора интенсивно встряхивают в течение 10-20 с, в случае образования кристаллов помещают флакон на водяную баню при температуре 37°C и выдерживают до полного растворения кристаллов.

Рабочий промывочный раствор готовят в стакане вместимостью 500 мл, разбавляя концентрат промывочного раствора дистиллированной водой в соотношении 1:9 (например, 10 мл – концентрата, 90 мл – воды). Раствор интенсивно перемешивают, не допуская образования пены.

Раствор переносят в емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ – 1 мес.

6.5 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 проведение подготовки проб замороженные пробы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 до плюс 4 °С.

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

Доводят температуру пробы, отобранной в соответствии с п. 7,1, до значений от плюс 20 до плюс 25°С, выдерживая его 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, просеивают через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм и тщательно перемешивают. Остаток пробы на сите снова измельчают на мельнице лабораторной 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 продукции и спиртового производства измельчают с помощью гомогенизатора или бытового блендера, перемешивают. Пробы мукомольных изделий, глютенных – тщательно перемешивают

Взвешивают $(5,0 \pm 0,1)$ г измельченной пробы. Навеску исследуемой 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 пробы : 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 раствор выдерживают в течение 5-10 мин для осаждения частиц пробы и быстро фильтруют от 10 до 15 мл верхнего слоя в стеклянную пробирку или колбу через бумажный фильтр «белая лента». Контроль pH фильтрата проводят с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения pH 6-8 с использованием концентрированной соляной кислоты или 20 %-го раствора 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 ($5,0 \pm 0,1$) г и 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 pH с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения pH 6-8 с использованием 20 %-го раствора гидроксида натрия.

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

7.4 Подготовка проб орехов

Навеску исследуемой пробы гомогенизируют с помощью блендера или гомогенизатора, взвешивают ($2,5 \pm 0,1$) г и помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл. Добавляют 1,25 г хлористого натрия, перемешивают и цилиндром добавляют 12,5 мл 70 %-ного раствора метанола, затем добавляют 5 мл гексана. 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. Удаляют верхний слой жира и гексана с помощью пастеровской пипетки. Переносят надосадочную жидкость в пробирку или колбу и проводят контроль pH с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения pH 6-8.

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

7.4.1. Альтернативный способ для проб орехов (с высоким содержанием масел)

Навеску исследуемой пробы гомогенизируют с помощью блендера или гомогенизатора, взвешивают ($2,0 \pm 0,1$) г, помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, добавляют 4 мл воды дистиллированной или деионизованной и цилиндром добавляют 16 мл хлористого метилена. 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. Отбирают 4 мл органического слоя

(нижний над осадком) в чистую центрифужную полипропиленовую (стеклянную) пробирку вместимостью 15 мл и полностью выпаривают 4 мл органического экстракта в слабом токе азота при (50 –55) °С. Затем осадок растворяют в 2,5 мл 70 %-ного метанола и добавляют 4 мл гексана. 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. Удаляют верхний слой гексана с помощью пастеровской пипетки и переносят метанольный экстракт в пробирку и проводят контроль рН с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения рН 6-8.

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

7.5 Пищевые растительные масла

Навеску исследуемой пробы массой (1,0±0,1) г помещают в полипропиленовую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 мл, добавляют 4 мл 70%-ного раствора метанола и 4 мл гексана. 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 10 °С. Удаляют верхний слой жира и гексана с помощью пастеровской пипетки. Переносят метанольный экстракт в пробирку и проводят контроль рН с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения рН 6-8.

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

7.6 Сушеное мясо/рыба

Навеску исследуемой пробы массой (5,0±0,1) г мелко измельчают, помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, добавляют 25 мл 70%-ного раствора метанола и 10 мл гексана. 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. Удаляют верхний слой жира и гексана с помощью пастеровской пипетки. Переносят метанольный экстракт в пробирку или колбу и проводят контроль рН с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения рН 6-8.

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

7.7 Подготовка проб для анализа

В чистую пробирку отбирают дозатором 0,5 мл экстрактов проб (п.7.2-7.6) и добавляют 0,5 мл промывочного буфера, приготовленного по п.6.4. Пробирку закрывают пробкой, раствор перемешивают и используют для проведения ИФА.

8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

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

8.2 Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб 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 ₄	П ₄								
B	C ₁	C ₁	П ₅	П ₅								
C	C ₂	C ₂	П ₆	П ₆								
D	C ₃	C ₃	П ₇	П ₇								
E	C ₄	C ₄	П ₈	П ₈								
F	П ₁	П ₁	П ₉	П ₉								
G	П ₂	П ₂	П ₁₀	П ₁₀								
H	П ₃	П ₃	П ₁₁	П ₁₁								

Примечания:

1. C₀-C₄ – градуировочные растворы в лунках А-Е стрипов №1 и №2, П₁-П₁₁ – растворы проб в лунках F-H стрипов №1 и №2 и в лунках А-Н стрипов №3 и № 4.
2. Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальную пипетку. Не следует использовать более 4 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 немедленно помещают в фольгированный пакет, заклеивают его клейкой 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 1,0 мл на стрип.

Восьмиканальным дозатором отбирают по 100 мкл конъюгата и вносят в лунки планшета для смешивания (возможно использование одноканального дозатора). Затем в лунки планшета для смешивания в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 50 мкл градуировочных растворов в порядке возрастания их концентраций и растворов исследуемых проб, приготовленных в соответствии с п.7.7.

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 100 мкл полученной смеси в соответствующие лунки иммуносорбента.

Примечание – Временной интервал от начала перемешивания до начала инкубирования – не более 3 мин с тем, чтобы минимизировать возможные артефакты, обусловленные разным временем протекания иммунохимической реакции в первых и последних стрипах.

9.3 Иммуносорбент заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре (20-25)°C в течение 20 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет.

9.4 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем с помощью восьмиканальной пипетки промывают лунки 4 раза по 200 мкл каждую рабочим промывочным раствором (п. 6.4), который предварительно вносят в чистую ванночку в объеме из расчета 6,5 мл на один стрип.

При промывании планшета необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости, не допуская переполнения лунок и перетекания промывочного раствора 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 в объеме из расчета 1 мл на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрывают планшет изолирующим листком или крышкой и инкубируют в течение 5 мин в термостате или на воздухе способом, исключая попадание света, при температуре (20-25)°C.

9.6 Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 100 мкл 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 В течение не более 15 мин после остановки реакции измеряют в планшетном спектрофотометре ОП растворов в лунках при длине волны 450 нм.

10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Для построения градуировочного графика и расчета массовой доли афлатоксина В1 в анализируемых образцах 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 афлатоксина В1 в градуировочных растворах в терминах массовых концентраций (мкг/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 $\logit B_i/B_0$ (ось ординат) от десятичного логарифма концентрации $\log C_i$ (ось абсцисс)

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

где 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 – массовая доля афлатоксина В1 в градуировочном растворе, выраженная в мкг/кг.

Программа автоматически рассчитывает на основании градуировочного графика массовую долю афлатоксина В1 мкг/кг в лунках с анализируемой пробой после внесения оператором значений оптической плотности B_p , 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 первого десятичного знака

10.3 Интерпретация результатов

В случае, когда массовая концентрация афлатоксина В1 в растворе пробы превышает максимальное значение массовой концентрации афлатоксина В1 в градуировочном растворе C_4 , то есть, когда результат измерений оптической плотности раствора пробы менее оптической плотности градуировочного раствора с массовой концентрацией 40,0 мкг/кг, проводят разбавление подготовленного раствора пробы, используя для разбавления 35%-ный метанол. Полученный результат измерений умножают на кратность разбавления.

11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАБОРА

11.1 Параметры ИФА для градуировочных растворов – связывание конъюгата афлатоксин-пероксидаза: B_0 – от 1,3 до 2,8 о.е; B_1/B_0 – не более 95 %, B_4/B_0 – не более 35% .

11.2 Чувствительность: минимальная концентрация афлатоксина в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью набора не превышает 1,0 мкг/кг.

11.3 Специфичность. В наборе МУЛЬТИСКРИН® Афлатоксин В1 при изготовлении иммуносорбента используются высокоспецифичные антитела к афлатоксину. Относительно афлатоксина В1 (100 %) значения кросс-реактивностей для афлатоксина В2 – 18,5 %, афлатоксина G1 – 13,2 %, афлатоксина G2 – 1,9 %.

11.4 Диапазон измерений составляет от 1,5 до 40,0 мкг/кг. Для кормов и продукции комбикормовой промышленности и зеленых, сочных и грубых кормов от 2,0 до 40,0) мкг/кг.

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

11.6 Повторяемость (коэффициент вариации) результатов определения афлатоксина В1 в контрольных пробах различных видов продуктов в одной постановке ИФА не превышает 15 %.

11.7 Воспроизводимость (коэффициент вариации) результатов определения афлатоксина В1 в контрольных пробах различных видов продуктов в нескольких постановках ИФА в нескольких лабораториях не превышает 25 %.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

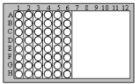
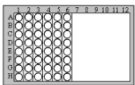
12.1 Набор хранят в упаковке изготовителя при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности, замораживания не допускают.

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 5.2 – внесены дополнительные реактивы п. 7 – изменено название п. 7.3 – добавлена пробоподготовка для зеленых, сочных и грубых кормов п. 7.4 – добавлена пробоподготовка для орехов п. 7.4.1 – добавлена пробоподготовка для орехов с высоким содержанием масла п. 7.5 – добавлена пробоподготовка для масел растительных п. 7.6 – добавлена пробоподготовка для сушеного мяса и рыбы п. 7.7 – изменена подготовка проб для анализа п. 11.2 – увеличена чувствительность набора п. 11.4 – изменен диапазон измерений набора
2.1	Внесены изменения в п. 2.1 – добавлена клейкая пленка
2.2	Обновлен п. 6.1

Таблица 3 – Схема анализа

Подготовка экстрактов анализируемых проб		Смешать 0,5 мл экстракта и 0,5 мл рабочего промывочного раствора
Разбавление концентрата промывочного раствора		Разбавить необходимое количество концентрата промывочного раствора дистиллированной водой
Подготовка иммуносорбента		Вставить необходимое количество стрипов с иммобилизованными антигенами
Подготовка планшета для смешивания		Вставить необходимое количество стрипов
<i>Планшет для смешивания</i>		
Внесение раствора конъюгата		Добавить по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Внесение градуировочных растворов и растворов анализируемых проб		Добавить по 50 мкл градуировочного раствора и раствора пробы в соответствующую лунку
<i>Иммуносорбент</i>		
Перенесение содержимого из планшета для смешивания в иммуносорбент		Перенести по 100 мкл перемешанных проб из планшета для смешивания в соответствующие лунки иммуносорбента
Инкубация		Выдержать при температуре (20-25) °С в темноте в течение 20 мин
Промывание		Промыть четыре раз промывочным раствором порциями по 200 мкл на каждую лунку
Внесение хромоген-субстратного раствора		Добавить по 100 мкл в каждую лунку и выдержать 5 мин в темноте при температуре (20-25) °С.
Внесение стоп-реактанта		Добавить по 100 мкл в каждую лунку
Измерение оптической плотности		Измерить на микропланшетном фотометре, длина волны 450 нм