СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке БелГИМ

_____ В.А. Коломиец

«16» 11 2015 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Компания Альгимед»

_____ В.В. Лютынский

«11» ноября 2015 г.

Методика выполнения измерений содержания антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal® и ИФА антибиотик - тетрациклин

МВИ.МН 3830-2015

(взамен МВИ.МН 3830-2014)

Республиканское унитарное предприятие «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 909 / 2015
об аттестации МВИ от 16.11 20 15 г.

МИНСК 2015

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г. МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения ... 3
2 Точность измерений ... 4
3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы ... 6
4 Метод измерений ... 9
5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов ... 10
5.1 Общие требования безопасности ... 10
5.2 Требования к квалификации операторов ... 10
6 Условия выполнения измерений ... 10
7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении ... 10
8 Условия хранения набора реагентов ... 10
9 Подготовка к выполнению измерений ... 11
9.1 Отбор образцов ... 11
9.2 Подготовка лабораторной посуды ... 11
9.3 Приготовление растворов ... 11
9.4 Подготовка набора реагентов ... 14
9.5 Подготовка проб ... 17
10 Выполнение измерений ... 23
10.1 Общие требования ... 23
10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа ... 23
11 Обработка результатов измерения ... 25
11.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости ... 27
12 Оформление результатов измерений ... 28
12.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности ... 28
12.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов с использованием предела измерения ... 28
12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов с использованием значения верхней границы диапазона измерений ... 28
13 Контроль точности результатов измерений ... 29
13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости ... 29
13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности ... 29
13.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости ... 29
13.4 Контроль правильности ... 31
13.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) ... 32
14 Нормативные ссылки ... 34
Библиография ... 35

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
Компания Альгиред
г.МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ
Государственный институт научно-технической информации

1 Область применения

Настоящая методика распространяется на молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, масло сливочное, сыр, творог, йогурт, кефир, сметану, молочную сыворотку, восстановленную сухую молочную сыворотку, мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыбу, креветки, яйца, мед и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания антибиотиков группы тетрациклинов (тетрациклина, хлортетрациклина, ролитетрациклина, демеклоциклина, окситетрациклина).

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов[1] с использованием набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)», каталожный номер 1016-04C («MaxSignal® Tetracycline (TET Group) ELISA Test Kit», Reference # 1016-04C) производства BIOO Scientific Corporation (США), или набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин», производства ООО «Кампания Альгимед» (Республика Беларусь), далее набор реагентов.

Диапазон измерений методики при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» составляет:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, йогурта, кефира, сметаны, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки[2] – от 0,60 до 12,80 мкг/кг;
- для молока сухого – от 6,00 до 128,00 мкг/кг;
- для мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок – от 1,50 до 16,00 мкг/кг;
- для масла сливочного, сыра, творога, яиц, меда – от 3.00 до 32,00 мкг/кг.

Диапазон измерений методики при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» составляет:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, йогурта, кефира, сметаны, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, сыра, творога, яиц, молока сухого[3] – от 1,00 до 16,00 мкг/кг;
- для мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок, масла сливочного – от 1,00 до 160,00 мкг/кг;
- для меда– от 3,00 до 32,00 мкг/кг.

Предел измерения методики при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» составляет:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, восстановленной *сухой молочной сыворотки – 0,60 мкг/кг*;
- для молока сухого – 6,00 мкг/кг;
- для мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок – 1,50 мкг/кг;

---

[1] Массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в соответствии с данной методикой определяется как сумма массовых концентраций тетрациклина, хлортетрациклина, ролитетрациклина, демеклоциклина, окситетрациклина в пересчете на тетрациклин с учетом перекрестной чувствительности, специфицируемой производителем вышеуказанного набора реагентов

[2] Здесь и далее по тексту результат измерений массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в восстановленной сухой молочной сыворотке относится к восстановленному согласно данной методике продукту

[3] Здесь и далее по тексту результат измерений массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» в сухом молоке относится к восстановленному согласно данной методике продукту

КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

- для масла сливочного, сыра, творога, яиц, меда – 3,00 мкг/кг.

Предел измерения методики при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» составляет:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, йогурта, кефира, сметаны, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, сыра, творога, яиц, молока сухого, мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок, масла сливочного – 1,00 мкг/кг;
- для меда – 3,00 мкг/кг.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Точность измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в указанном выше диапазоне с показателями точности, указанными в таблицах 1, 2.

В результате оценки показателя правильности для данной методики была установлена незначимость смещения для всех видов продукции во всем диапазоне измерений, за исключением мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин». Статистическая значимость смещения учтена при оценивании неопределенности для результатов измерений, получаемых для вышеуказанных видов продукции при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин».

Значения оценок относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности приведены в таблицах 3, 4.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(ПП)}$, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	от 0,60 до 12,80 включ.	4,3	5,3
Молоко сухое	от 6,00 до 128,00 включ.	4,5	6,4
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 0,60 до 12,80 включ.	2,1	5,2
Масло сливочное, сыр, яйца	от 3,00 до 32,00 включ.	3,2	5,6
Творог	от 3,00 до 32,00 включ.	4,0	5,4
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки	от 1,50 до 16,00 включ.	5,2	8,3
Мед	от 3,00 до 32,00 включ.	3,2	5,3
Йогурт, кефир, сметана	от 0,60 до 12,80 включ.	5,5	7,4

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ * РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ * КОМПАНИЯ АЛЬЯНС * г.МИНСК * ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ *

Таблица 2 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{R(w)}$, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 1,00 до 16,00 включ.	5,5	6,0
Йогурт, сметана, кефир, творог, молоко сухое	от 1,00 до 16,00 включ.	4,4	5,5
Сыр, яйца	от 1,00 до 16,00 включ.	4,8	5,5
Масло сливочное	от 1,00 до 160,00 включ.		
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки	от 1,00 до 160,00 включ.	4,8	9,7
Мед	от 3,00 до 32,00 включ.		

Таблица 3 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность U, %, $K = 2, P = 95$ %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	от 0,6 до 12,80 включ.	6	12
Молоко сухое	от 6,00 до 128,00 включ.	7	14
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 0,60 до 12,80 включ.	7	14
Масло сливочное, сыр, яйца	от 3,00 до 32,00 включ.	7	14
Творог	от 3,00 до 32,00 включ.	6	12
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки	от 1,50 до 16,00 включ.	9	18
Мед	от 3,00 до 32,00 включ.	6	12
Йогурт, кефир, сметана	от 0,60 до 12,80 включ.	8	16

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г. МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

Таблица 4 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность U, %, $K=2, P=95$ %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 1,00 до 16,00 включ.	9	18
Йогурт, сметана, кефир, творог, молоко сухое	от 1,00 до 16,00 включ.	9	18
Сыр, яйца	от 1,00 до 16,00 включ.	9	18
Масло сливочное	от 1,00 до 160,00 включ.		
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки	от 1,00 до 160,00 включ.	12	24
Мед	от 3,00 до 32,00 включ.		

Указанные в таблицах 1 – 4 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2;
- показатели правильности – [1];
- оценки неопределенности – [1], [2].

3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 500 г, ценой деления не более 0,01 г.

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более ± 5 %), например EMax Plus, производства Molecular Devices LLC, США.

Программное обеспечение «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанное BIOO Scientific Corporation (США), при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;

Программное обеспечение «ПО ИФАантибиотик – тетрациклин», разработанное ООО «Компания Альгимед» при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин».

Термометр лабораторный частичного погружения класса точности I с ценой деления 1 °С по ГОСТ 28498.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g, (пробирки вместимостью 2 см^3), относительное центробежное ускорение не менее 4000 g и частоту вращения [illegible] (пробирки вместимостью 15 см^3), например Rotofix 32A, производства Hettich Lab Technology Aps, Германия.

Компания Альгимед г. Минск для документов

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 20 °С в морозильной камере.

Лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин, например MSV-3500, производства BioSan Ltd, Латвия.

Лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин, например термошейкер PST-60HL, производства BioSan Ltd, Латвия.

Гомогенизатор лабораторный типа ULTRA-TURRAX производства IKA® Werke GmbH & Co. KG (Германия), например Ultra Turrax DI 25 Digital или бытовой блендер.

pH-метр с диапазоном измерений от 0 pH до14 pH и погрешностью ± 0,1pH в комплекте с электродами, например pH-221 производства HANNA instruments®, Inc., США.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры от 70 °С до 75 °С, (51 ± 1) ^{0}С;.

Дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников, например Acura manual 825, Acura manual 835, Acura manual 855 производства Socorex ISBA S.A., Швейцария:

- с диапазоном объемов дозирования от 10 до 100 мм^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 2,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 см^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 2,0 %;
- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,5 %.

Использование следующего оборудования не является обязательным, но рекомендуется для увеличения производительности и повышения точности измерений:

- Инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью ± 1 °С, например Thermomixer comfort производства Eppendorf AG, Германия в комплекте с термоблоком для микротитровальных планшетов.
- Устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету от 100 мм^3 до 350 мм^3, например 3D-IW8, производства BioSan Ltd, Латвия.

Пленка «парафильм» или скотч.

Микрофибровые салфетки, например Ultrafine 30x30, производства Marumi Optical Co. Ltd.

Бумага индикаторная с интервалом изменения pH от 5 до 8, например индикаторная бумага лакмоидная синяя по [3].

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Шпатели пластиковые.

Штатив для пробирок.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 см^3.

Пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 2 см^3.

Пробирки стеклянные вместимостью 5 см^3 типа [illegible] 10 см^3 типа П-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г.МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

Колбы мерные вместимостью 1000 $см^3$ типа 2–1000–2 по ГОСТ 1770.

Колбы конические вместимостью 100 $см^3$, 250 $см^3$, 500 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Воронки типа В-56-80 ХС, В-75-110 ХС по ГОСТ 25336.

Стаканы Н-1 - 100 или Н-1 - 150 по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-2-20, 1-2-25 по ГОСТ 29169.

Цилиндры мерные вместимостью 25 $см^3$, 100 $см^3$ типа 3–25–2, 3–100–2 по ГОСТ 1770.

Натрия фосфат двуосновной (Na_2HP0_4), каталожный номер Sigma-Aldrich S7907 или натрий фосфорнокислый двузамещенный 2-водный ($Na_2HP0_4 \cdot 2H_2O$) ч.д.а по ГОСТ 245.

Натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233.

Калий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4234.

Натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328.

Кислота соляная ч.д.а. по ГОСТ 3118.

Калий фосфорнокислый однозамещенный х.ч. (ч.д.а.) по ГОСТ 4198.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

н-Гексан ч. по [4].

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Набор реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)», каталожный номер 1016-04C («MaxSignal® Tetracycline (TET Group) ELISA Test Kit», Reference # 1016-04C), производства BIOO Scientific Corporation (США), или набор реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» по [5], производства ООО «Кампания Альгимед» (Республика Беларусь) – набор реактивов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению концентрации антибиотиков группы тетрациклинов методом иммуноферментного анализа в составе (таблицы 5, 6).

Таблица 5 – Состав наборов реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых тетрациклином)	1 шт
Основной стандарт тетрациклина массой 225 нг (порошок) для приготовления градуировочных растворов	3 шт
Флаконы для приготовления градуировочных растворов тетрациклина с концентрацией 0 нг/$см^3$, 0,05 нг/$см^3$, 0,15 нг/$см^3$, 0,40 нг/$см^3$, 0,80 нг/$см^3$, 1,60 нг/$см^3$	6 шт
Раствор антител к тетрациклину № 1	12 $см^3$
Конъюгат антител с пероксидазой № 2 (100× концентрат)	0,3 $см^3$
Растворитель для антител № 2	20 $см^3$
Промывочный раствор (20× концентрат)	28 $см^3$
Стоп-реагент	14 $см^3$
ТМБ субстрат	12 $см^3$
Экстракционный ОХТЕТ-буфер (5× концентрат)	2×25 $см^3$
Растворитель для приготовления градуировочных растворов	28 $см^3$
ТЕТ-реагент для очистки проб молока	10 $см^3$
ТЕТ-буфер для доведения проб молока	25 $см^3$
ТЕТ-буфер для доведения проб мяса	25 $см^3$

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г. МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

Таблица 6 – Состав наборов реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

Компонент набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых тетрациклином)	1 шт
Градуировочные растворы с концентрацией 0 нг/см^3, 0,05 нг/см^3, 0,15 нг/см^3, 0,40 нг/см^3, 0,80 нг/см^3, 1,60 нг/см^3	6 шт по 1,2 см^3
Раствор антител к тетрациклину	12 см^3
Коньюгат	0,3 см^3
РРК	20 см^3
Концентрат промывочного раствора (КПР)	28 см^3
Стоп-реагент	14 см^3
ТМБ субстрат	12 см^3
5-ти кратный концентрат экстракционного буферного раствора	2×25 см^3
Концентрат буферного раствора для доведения проб	5 см^3
10-ти кратный концентрат натрий-фосфатного буферного раствора	28 см^3

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера в наборах реагентов производства BIOO Scientific Corporation:

- растворитель для антител № 2;
- промывочный раствор;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат.

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера серии в наборах реагентов производства ООО «Кампания Альгимед»:

- РРК;
- 5-ти кратный концентрат экстракционного буферного раствора;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат.

4 Метод измерений

Используемый метод основан на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого тетрациклином, вместе с пробой добавляют первичные антитела, специфичные к тетрациклину. Присутствующие в пробе антибиотики группы тетрациклинов конкурируют с тетрациклином, нанесенным на стенки лунок, за связывание с внесенными антителами. После внесения вторичных антител, коньюгированных с ферментом пероксидазой, последние связываются с первичными антителами, связанными с тетрациклином на стенках лунки. После добавления субстрата, а затем стоп-реагента, измеряется оптическая плотность раствора при 450 нм. Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации тетрациклина в градуировочном растворе и антибиотиков группы тетрациклинов в растворе пробы. Массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г. МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Общие требования безопасности

При выполнении работ в соответствии с данной методикой персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;
- техники безопасности при работе в химической лаборатории в соответствии с инструкциями, утвержденными в установленном порядке;
- техники безопасности, изложенные в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений.

5.2 Требования к квалификации операторов

К проведению работ по данной методике допускаются лица, имеющие высшее специальное или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа.

6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 ^{0}С до плюс 25 ^{0}С;
- температура при приготовлении растворов (20 ± 2) ^{0}С;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25 °С.

7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

При отсутствии инкубатора микротитровальные планшеты могут инкубироваться в помещении при выполнении следующих условий:

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 ^{0}С до плюс 25 ^{0}С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, рекомендуется помещать под него теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце.
- при низкой относительной влажности воздуха и наличии воздушных потоков с целью устранения возможности испарения содержимого лунок рекомендуется покрывать планшет пленой «парафильм» или заклеивать скотчем.
- в особых случаях, которые оговорены по тексту МВИ, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например в ящик стола.

8 Условия хранения набора реагентов

Хранение набора реагентов осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке. Микротитровальные

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Комитет Альгимед г. Минск для документов

планшеты должны храниться в плотно закрытой упаковке. Если набор реагентов не планируется использовать более одного месяца, то следующие компоненты рекомендуется хранить при температуре минус 20 °С:

- основной стандарт тетрациклина, раствор антител к тетрациклину № 1, конъюгат антител с пероксидазой № 2 (набор реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;
- конъюгат, антитела к тетрациклину, градуировочные растворы (набор реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»).

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С в течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 20 °С в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб по п. 9.5 замороженные образцы должны быть размморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С.

9.2 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе специализированного моющего средства промывают водопроводной, ополаскивают дистиллированной водой 2 раза и высушивают.

Запрещается:

- многократное использование одноразовой лабораторной посуды;
- использование бытовых моющих средств для мойки лабораторной посуды.

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Приготовление растворов, используемых при работе с набором реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

9.3.1.1 Приготовление 30 % раствора гидроокиси натрия

Навеску гидроокиси натрия массой 15,0 г, взвешенную с погрешностью не более 0,1 г, помещают в коническую колбу вместимостью 250 $см^3$. В колбу приливают 35 $см^3$ дистиллированной воды, отмеренной цилиндром. После растворения гидроокиси натрия раствор охлаждают до комнатной температуры (от плюс 20 °С до плюс 25 °С). Раствор используют свежеприготовленным.

9.3.1.2 Приготовление 10 мМ фосфатно-солевого буфера

Навески калия фосфорнокислого однозамещенного массой 0,240 г, калия хлористого массой 0,200 г, взвешенные с погрешностью не более 0,001 г, а также натрия фосфата двуосновного массой 1,44 г (или натрия фосфорнокислого двузамещенного 2-водного массой 1.87 г), хлористого натрия массой 8,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, перемешивают до полного растворения и доводят до метки дистиллированной водой. После приготовления раствора его pH доводят до 7,4, добавляя по каплям 30 % раствор гидроокиси натрия,

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г.Минск для документов

приготовленный по п. 9.3.1.1. Раствор хранят при комнатной температуре (от плюс 20 °С до плюс 25 °С) не более одного месяца.

9.3.1.3 Приготовление экстракционного ОХТЕТ-буфера

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 или 250 см^3 (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту концентрата экстракционного ОХТЕТ-буфера, добавляют цилиндром в 4 раза больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата экстракционного ОХТЕТ-буфера рассчитывается на основании количества анализируемых образцов мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок, масла, сыра, творога, яиц по формуле

$$V = \frac{6N_{smp} + V_1}{5}, \qquad (1)$$

где N_{smp} – количество вышеперечисленных анализируемых образцов;

V_1 – объем экстракционного ОХТЕТ-буфера, приготавливаемого в запас, см^3 (не менее 1 см^3).

Экстракционный ОХТЕТ-буфер приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.3.1.4 Приготовление 1 М раствора NaOH

Навеску гидроокиси натрия массой 4,00 г, взвешенную с погрешностью 0,01 г, вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют дистиллированную воду в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно на половину своей вместимости. После растворения гидроокиси натрия, раствор доводят до метки дистиллированной водой. Раствор хранят при температуре (20 ± 5) ^{0}С в плотно закрытой полиэтиленовой или фторопластовой посуде не более одного месяца.

9.3.1.5 Приготовление 1 М раствора HCl

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 наливают 50 – 70 см^3 дистиллированной воды, затем добавляют отмеренные пипеткой 8,5 см^3 концентрированной соляной кислоты плотностью 1,18 г/см^3. После перемешивания раствора доводят объем до метки дистиллированной водой. При использовании кислоты другой плотности ее объем необходимо пересчитывать. Раствор хранят при температуре (20 ± 5) ^{0}С не более одного месяца.

9.3.2 Приготовление растворов, используемых при работе с набором реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

9.3.2.1 Приготовление натрий-фосфатного буферного раствора

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 или 250 см^3 (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту концентрата натрий-фосфатного буферного раствора, добавляют цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата натрий-фосфатного

Компания «Кей Имекс» г. Минск для документов

буферного раствора рассчитывается на основании количества анализируемых образцов меда по формуле

$$V = \frac{7,6N_{smp} + V_1}{10}, \quad (2)$$

где N_{smp} – количество вышеперечисленных анализируемых образцов;

V_1 – объем натрий-фосфатного буферного раствора, приготавливаемого в запас, $см^3$ (не менее 1 $см^3$).

Раствор хранят при температуре от 4 °С до 8 °С не более одного месяца.

9.3.2.2 Приготовление экстракционного буферного раствора

В коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ или 250 $см^3$ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 5-ти кратного концентрата экстракционного буферного раствора, добавляют цилиндром в 4 раза больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V, $см^3$, концентрата рассчитывается на основании количества анализируемых образцов всех видов продукции, кроме меда, по формуле

$$V = \frac{6N_{smp} + V_1}{5}, \quad (3)$$

где N_{smp} – количество вышеперечисленных анализируемых образцов;

V_1 – объем экстракционного буферного раствора, приготавливаемого в запас, $см^3$ (не менее 3 $см^3$).

Экстракционный буферный раствор приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.3.2.3 Приготовление буферного раствора для разбавления проб

В коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ приливают дозатором или цилиндром аликвоту 10-кратного концентрата буферного раствора для разбавления проб, добавляют цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V, $см^3$, концентрата рассчитывается на основании количества анализируемых образцов мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок, масла сливочного при подготовке проб согласно п. 9.5.3.7 по формуле

$$V = \frac{1,8N_{smp} + V_1}{10}, \quad (4)$$

где N_{smp} – количество вышеперечисленных анализируемых образцов;

V_1 – объем буферного раствора для разбавления проб, приготавливаемого в запас, $см^3$ (не менее 5 $см^3$).

Буферный раствор для разбавления проб приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.3.2.4 Приготовление буферного раствора для доведения проб

В коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ приливают дозатором или цилиндром

КОПИЯ ВЕРНА С ОРИГИНАЛОМ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г. МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

аликвоту концентрата буферного раствора для доведения проб, добавляют цилиндром в 99 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 9.3.2.3 и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата рассчитывается на основании количества анализируемых образцов всех видов продукции, кроме меда, по формуле

$$V = \frac{0,6N_{smp} + V_1}{100}, \quad (5)$$

где N_{smp} – количество вышеперечисленных анализируемых образцов;

V_1 – объем буферного раствора для доведения проб, приготавливаемого в запас, см^3 (не менее 5 см^3).

Буферный раствор для доведения проб приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.4 Подготовка набора реагентов

9.4.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С от 1 до 2 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

При работе необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты набора реагентов.

Растворы из набора реагентов следует готовить непосредственно перед проведением ИФА. Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать остатки реагентов обратно в оригинальные флаконы.

9.4.2 Подготовка микротитровального планшета

Количество лунок микротитровального планшета, необходимых для проведения измерений N_w, рассчитывается по формуле

$$N_w = 12 + 2N_{SMP}, \quad (6)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные в соответствии с п. 9.4.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок N_w. Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 8.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят с учетом выполнения по два параллельных измерения градуировочных растворов и образцов согласно схеме, предлагаемой программным обеспечением

- «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанное BIOO Scientific Corporation (США), при использовании набора реагентов

Общество с ограниченной ответственностью «Альгимед» г. Минск Республика Беларусь для документов

«MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;

- «ПО ИФАантибиотик – тетрациклин», разработанное ООО «Компания Альгимед» при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин».

Не рекомендуется одновременно использовать более шести стрипов. Если необходимо провести измерение более 18 образцов, ИФА выполняется несколько раз.

9.4.3 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 9 $см^3$ приливают в колбу вместимостью 250 $см^3$ или 500 $см^3$ и добавляют отмеренную цилиндром вместимостью 25 $см^3$ или 100 $см^3$ (в зависимости от добавляемого объема) дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 19 раз больше, чем объем концентрата промывочного раствора. После перемешивания содержимое колбы переливают в емкость с закручивающейся пробкой. Если приготовленный объем раствора не превышает 50 $см^3$, то для его приготовления и хранения могут использоваться пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 6-ти недель в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

9.4.4 Приготовление растворов при работе с набором реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

9.4.4.1 Приготовление основного раствора тетрациклина с концентрацией 150 нг/$см^3$

К содержимому флакона с основным стандартом тетрациклина добавляют 1,5 $см^3$ растворителя для приготовления градуировочных растворов, отмеренного дозатором. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Полученный основной раствор тетрациклина хранению не подлежит и должен быть использован в течение дня.

9.4.4.2 Приготовление градуировочных растворов тетрациклина

Градуировочные растворы тетрациклина готовят путем последовательного разбавления основного раствора тетрациклина с концентрацией 150 нг/$см^3$, приготовленного по п. 9.4.4.1, следующим образом. В соответствующий флакон для хранения градуировочных растворов вносят аликвоту раствора тетрациклина и аликвоту растворителя для приготовления градуировочных растворов. Раствор тетрациклина, от которого отбирается аликвота, и объемы аликвот раствора и растворителя, используемые для приготовления градуировочных растворов, указаны в таблице 7. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Полученные градуировочные растворы тетрациклина хранению не подлежат и должны быть использованы в течение дня. После использования остатки градуировочных растворов должны быть удалены из флаконов, подлежащих хранению. Пустые флаконы должны храниться в составе набора реагентов в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С и использоваться при последующем приготовлении градуировочных растворов.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
Г. МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

Таблица 7 – Схема приготовления градуировочных растворов

Номер град. раствора	Концентрация градуировочного раствора, нг/см^3	Источник аликвоты раствора тетрациклина для приготовления градуировочного раствора	Объем аликвоты раствора тетрациклина	Объем растворителя для приготовления градуировочных растворов
6	1,60	основной раствор	20 мм^3	1855 мм^3
5	0,80	град. раствор № 6	500 мм^3	500 мм^3
4	0,40	град. раствор № 5	500 мм^3	500 мм^3
3	0.15	град. раствор № 4	375 мм^3	625 мм^3
2	0,05	град. раствор № 3	200 мм^3	400 мм^3
1	0,00	–	–	500 мм^3

9.4.4.3 Приготовление конъюгата антител с пероксидазой № 2

В стеклянную пробирку вместимостью 5 см^3 или 10 см^3 (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 объемом не менее 20 мм^3, добавляют дозатором в 99 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем растворителя для антител № 2. Содержимое пробирки тщательно перемешивается путем вращения или переворачивания закрытой пробирки.

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 рассчитывается на основании количества используемых лунок микротитровального планшета по формуле

$$V = \frac{150N_w + V_1}{100}, \qquad (7)$$

где N_w – количество лунок микротитровального планшета, используемых при проведении измерений, рассчитывается по п. 9.4.2;

V_1 – объем конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготавливаемого в запас, мм^3 (не менее 300 мм^3).

Конъюгат антител с пероксидазой № 2 приготавливается непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

9.4.5 Приготовление растворов, используемых при работе с набором реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

9.4.5.1 Приготовление рабочего раствора конъюгата

В стеклянную пробирку вместимостью 5 см^3 или 10 см^3 (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту конъюгата объемом не менее 20 мм^3, добавляют дозатором в 99 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты конъюгата объем РРК. Содержимое пробирки тщательно перемешивается путем вращения или переворачивания закрытой пробирки.

Объем используемой аликвоты V, см^3, конъюгата рассчитывается на основании количества используемых лунок микротитровального планшета по формуле

$$V = \frac{150N_w + V_1}{100}, \qquad (8)$$

где N_w – количество лунок микротитровального планшета, используемых при

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
Альгимед
г.МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

проведении измерений, рассчитывается по п. 9.4.2;

V_1 – объем рабочего раствора конъюгата, приготавливаемого в запас, мм^3 (не менее 300 мм^3).

Рабочий раствор конъюгата приготавливается непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

9.5 Подготовка проб

9.5.1 Подготовка проб при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

9.5.1.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с разделом 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают. Дозатором отбирают параллельные пробы молока объемом 1 см^3 и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 см^3. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 мм^3 ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 110 мм^3, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 мм^3 ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.1.2 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 2 параллельные навески образца массой 6.25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навеске приливают небольшими порциями по 10 – 20 см^3 дистиллированную воду, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

При наличии в образце йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают. Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1.00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 см^3. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 мм^3 ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 110 мм^3, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 мм^3

Альгимед г. Минск для документов

ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают. Проверяют pH с помощью индикаторной бумаги. При необходимости доводят pH раствора до 7, добавляя дозатором по каплям 1 М раствор NaOH или HCl, приготовленные по пп. 9.3.1.4, 9.3.1.5.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.1.3 Подготовка проб сухого молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца сухого молока отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки вместимостью 10 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки или дозатора 9 $см^3$ дистиллированной воды. Содержимое пробирок встряхивают до полного растворения, после чего выдерживают в течение 15 мин и перемешивают.

Дозатором отбирают по 1 $см^3$ молока из каждой пробы и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 $см^3$. Затем в пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 $мм^3$ ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 110 $мм^3$, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 $мм^3$ ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.1.4 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца меда отбирают две параллельные навески массой 0,50 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки с закручивающимися крышками вместимостью от 15 $см^3$ до 50 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки и/или дозатора 9,5 $см^3$ 10 мМ фосфатно-солевого буфера, приготовленного по п. 9.3.1.1. Содержимое пробирок растворяют путем интенсивного встряхивания на шейкере в течение 10 мин.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.1.5 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

Компания Альгимед
г. Минск
Для документов

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 $см^3$ экстракционного ОХТЕТ-буфера, приготовленного по п. 9.3.2.1. Пробирки интенсивно встряхивают на шейкере в течение 30 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 об/мин, 10 мин.

В стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ приливают отмеренные дозатором 300 $мм^3$ ТЕТ-буфера для доведения проб мяса и добавляют отобранные дозатором 200 $мм^3$ надосадочной жидкости из пробирок с пробами, после чего перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 30 с.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.1.6 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога, яиц

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Образец масла, охлажденный до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Образец творога тщательно перетирают в ступке. Образец яиц гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 $см^3$ экстракционного ОХТЕТ-буфера, приготовленного по п. 9.3.2.1. Пробирки с пробами масла и сыра выдерживают на водяной бане при температуре от 70 °С до 75 °С в течение двух минут.

Затем пробирки с пробами помещают на шейкер и интенсивно встряхивают в течение 30 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 4000 об/мин, 10 мин.

В стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ приливают отмеренные дозатором 800 $мм^3$ 10 мМ фосфатно-солевого буфера, приготовленного по п. 9.3.1.1, и добавляют отбранные дозатором 200 $мм^3$ надосадочной жидкости из пробирок с пробами, после чего перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 30 с.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.2 Получение растворов проб молока, молока сухого, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны с фактором разбавления, увеличенным по сравнению с указанным в инструкции к набору реагентов

Если при проведении измерений в соответствии с разделом 10 проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны, сухого молока, полученные

Компания Альгимед для документов г.Минск

значения оптической плотности меньше, чем оптическая плотность градуировочного раствора с концентрацией тетрациклина 1,60 нг/см^3, то проводят повторные измерения растворов проб с увеличенным фактором разбавления. Приготовление растворов проб с увеличенным фактором разбавления проводят согласно пп. 9.5.1, 9.5.1.2, 9.5.1.3. при этом объем используемого ТЕТ-буфера для доведения проб молока должен составлять 690 мм^3.

9.5.3 Подготовка проб при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

9.5.3.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока, йогурта, кефира, творога

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с разделом 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Образец молока объемом 50-70 см^3 переносят в коническую колбу вместимостью 100 см^3 и тщательно перемешивают. При наличии в образце йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают. Образец творога тщательно перетирают в ступке.

Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают.

Две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г, переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 3 см^3 экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 9.3.2.2, и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм^3, избегая попадания жира, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм^3 буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 9.3.2.4, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.3.2 Подготовка проб сыра, яиц, сметаны

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Образец яиц после удаления скорлупы гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Образец сметаны тщательно перемешивают.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см^3 экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 9.3.2.2. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин.

Затем пробирки с пробами центрифугируют в следующем режиме: 4000 g,

КОМПАНИЯ АЛЬТЕМЕД г.Минск ЦЕНТР ДОКУМЕНТОВ

10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм^3, избегая попадания жира, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм^3 буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 9.3.2.4, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.3.3 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок, сливочного масла

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см^3 экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 9.3.2.2, 1 см^3 н-гексана (для образцов креветок н-гексан не добавляют). Содержимое пробирок перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин.

Затем пробирки с пробами центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм^3, избегая попадания жира, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм^3 буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 9.3.2.4, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.3.4 Подготовка проб сухого молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца сухого молока отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки вместимостью 10 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки или дозатора 9 см^3 дистиллированной воды. Содержимое пробирок встряхивают до полного растворения, после чего выдерживают в течение 15 мин и перемешивают.

Дозатором отбирают по 1 см^3 молока из каждой пробы и переносят пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 3 см^3 экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 9.3.2.2, и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

Общество с ограниченной ответственностью Компания Альгимед г. Минск Беларусь для документов

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм^3, избегая попадания жира, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм^3 буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 9.3.2.4, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.3.5 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 2 параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навеске приливают небольшими порциями по 10 – 20 см^3 дистиллированную воду, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Дозатором отбирают две параллельные пробы молочной сыворотки или восстановленной сухой молочной сыворотки объемом 1 см^3 и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 3 см^3 экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 9.3.2.2, и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм^3, избегая попадания жира, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм^3 буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 9.3.2.4, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.3.6 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца меда отбирают две параллельные навески массой 0,50 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки или дозатора 3,5 см^3 натрий-фосфатного буферного раствора, приготовленного по п. 9.3.2.1. Пробирки выдерживают при периодическом перемешивании на водяной бане при температуре (51 ± 1) ^{0}С до полного растворения пробы. Затем содержимое пробирок перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ г. МИНСК РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм^3, избегая попадания жира, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм^3 натрий-фосфатного буферного раствора, приготовленного по п. 9.3.2.1, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5.3.7 Получение растворов проб мяса, готовых мясных продуктов, рыбы, креветок, сливочного масла с увеличенным фактором разбавления

Если при проведении измерений в соответствии с разделом 10 проб мяса, готовых мясных продуктов, рыбы, креветок, сливочного масла полученные значения оптической плотности меньше, чем оптическая плотность градуировочного раствора с концентрацией тетрациклина 1,60 нг/см^3, то проводят повторные измерения растворов проб с увеличенным фактором разбавления. Для этого проводят дополнительное разбавление подготовленных по п. 9.5.3.3 растворов проб следующим образом. В стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 переносят по 100 мм^3 исходных растворов проб, после чего в пробирки добавляют отмеренные дозатором 900 мм^3 раствора для разбавления проб, приготовленного по п. , и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

10 Выполнение измерений

10.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.5. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с п. 9.4.

10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа

10.2.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 9.4.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 75 мм^3 каждого градуировочного раствора, приготовленного согласно п. 9.4.4.2 при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» или подготовленного по п. 9.4.1 при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин». Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,00, 0,05, 0,15, 0,40, 0,80, 1,60 нг/см^3). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 75 мм^3 двух параллельных проб каждого образца.

10.2.2 Добавление раствора антител

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 100 мм^3:

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г. МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

- раствора антител № 1 при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;
- раствора антител к тетрациклину при использовании набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин».

Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

10.2.3 Инкубация планшета

Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение:

- 50 мин при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;
- 55 мин при использовании набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин».

При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение указанного выше времени в помещении при условиях, приведенных в разделе 7.

10.2.4 Промывка планшета

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении). Выливают содержимое лунок планшета путем его резкого переворачивания. Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 промывочного раствора, приготовленного по п. 9.4.3, и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – от 3 до 4, объем заливаемого моющего раствора – 250 мм^3.

После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого сухим листом фильтровальной бумаги.

10.2.5 Добавление конъюгата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют по 150 мм^3:

- конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготовленного по п. 9.4.4.3, при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;
- рабочего раствора конъюгата, приготовленного по п. 9.4.5.1, при использовании набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин».

Аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

10.2.6 Инкубация планшета

Сразу же после добавления конъюгата планшет помещают в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение:

- 20 мин при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г. Минск для документов

- 25 мин при использовании набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин».

При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение указанного выше времени в защищенном от света месте при условиях, приведенных в разделе 7.

10.2.7 Промывка планшета

Промывают планшет в соответствии с п.10.2.4.

10.2.8 Добавление ТМВ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм^3 ТМБ субстрата, после чего сразу же начинают отсчет времени инкубации. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

Не допускается выливать обратно в оригинальный флакон остатки субстрата во избежание его контаминации.

10.2.9 Инкубация планшета

Планшет помещают в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 15 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 15 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

10.2.10 Завершение реакции окрашивания

Сразу же после окончания времени инкубации в лунки планшета добавляют по 100 мм^3 стоп-реагента, отмеренных дозатором, и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

10.2.11 Измерение оптической плотности

Немедленно после перемешивания вытирают микрофибровой салфеткой нижнюю наружную поверхность лунок планшета и измеряют оптическую плотность лунок планшета с помощью автоматического микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

11 Обработка результатов измерения

Программное обеспечение «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System» (при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)») или «ПО ИФАантибиотик – тетрациклин» (при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»), далее «программное обеспечение» производит обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью интерфейса программного обеспечения.

Программное обеспечение выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B/B_0 от натурального логарифма концентрации тетрациклина вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \qquad (9)$$

где B – оптическая плотность раствора тетрациклина;

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г.МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

B_0 – оптическая плотность 1–го градуировочного раствора с концентрацией тетрациклина 0,00 нг/см^3;

C – концентрация тетрациклина в растворе, нг/см^3.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью МНК на основании пар значений B_i/B_0 , $\ln C_i$ полученных для пяти градуировочных растворов, где ($i = 2..6$). C_i – концентрация i–го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум значениям оптической плотности параллельных измерений i–го градуировочного раствора.

Массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x/B_0 - a}{b}\right), \qquad (10)$$

где X – концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в пробе, мкг/кг;

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, приведенный в таблицах 8, 9.

Если при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» хотя бы один из результатов измерений оптической плотности параллельных проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны меньше оптической плотности градуировочного раствора с концентрацией тетрациклина 1,60 нг/см^3, то производят действия в соответствии с п. 9.5.2, после чего повторяют измерения согласно п. 10. Массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в таких пробах рассчитывается по формуле (10) с использованием в качестве F удвоенного значения фактора разбавления пробы, приведенного таблице 8.

Если при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» хотя бы один из результатов измерений оптической плотности параллельных проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок, сливочного масла меньше оптической плотности градуировочного раствора с концентрацией тетрациклина 1,60 нг/см^3, то производят действия в соответствии с п. 9.5.3.7, после чего повторяют измерения согласно п. 10. Массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в таких пробах рассчитывается по формуле (10) с использованием в качестве фактора разбавления значения F=100.

Таблица 8 – Значения факторов разбавления для подготовленных проб при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Наименование пробы	Фактор разбавления
Молоко сырое, стерилизованное, пастеризованное, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, кефир, йогурт, сметана	4
Молоко сухое	40
Яйца, масло сливочное, сыр, творог, мед	20
Мясо, рыба, готовые к употреблению мясные продукты, креветки	10

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г.Минск для документов

Таблица 9 – Значения факторов разбавления для подготовленных проб при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик – тетрациклин»

Наименование пробы	Фактор разбавления
Молоко сырое, стерилизованное, пастеризованное, кефир, йогурт, творог, молоко сухое, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, яйца, сыр, сметана, мясо, рыба, готовые к употреблению мясные продукты, креветки, сливочное масло	10
Мед	20

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 11.1

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \qquad (11)$$

где X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в параллельных пробах, мкг/кг.

Окончательный результат измерений округляют до второго десятичного знака.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений X_{LQ}, указанный в разделе 1 то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием предела измерения согласно п. 12.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 12.3.

11.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Рассчитывают расхождение между результатами измерений параллельных проб одного образца $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости r_{abs}. Если выполняется условие

$$|X_1 - X_2| \le r_{abs}, \qquad (12)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (11).

Абсолютное значение предела повторяемости r_{abs}, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$r_{abs} = 0{,}01 \cdot r \cdot \bar{X}, \qquad (13)$$

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений параллельных проб одного образца, мкг/кг;

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г.МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

r – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблице 10, %.

При невыполнении условия (12) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$\left(\bar{X} \pm U(X)\right), \text{ мкг/кг}$$

при доверительной вероятности P = 0,95, K=2

где $\bar{X}$ – результат измерений, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 11;

$U(X)$ – расширенная неопределенность результатов измерений, мкг/кг.

Расширенную неопределенность результата измерений $U(X)$, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$U(X) = 0{,}01 \cdot U \cdot \overline{X}, \qquad (14)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с МВИ, %, приведенная в таблице 3.

При необходимости может быть проведена оценка расширенной неопределенности измерений, выполняемых в соответствии с данной МВИ при ее реализации в конкретной лаборатории.

12.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов с использованием предела измерения

Если конечный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерения X_{LQ}, указанный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг

$$менее\ X_{LQ},$$

где X_{LQ} – конкретное значение предела измерений, указанное в разделе 1.

12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если конечный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL}, указанное в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг

$$более\ X_{HL},$$

где X_{HL} – конкретное значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 1.

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г. Минск для документов

13 Контроль точности результатов измерений

Контроль качества проведения измерений выполняется с периодичностью, установленной системой менеджмента качества в лаборатории, но обязательно:

- при внедрении методики;
- при появлении факторов, влияющих на стабильность процесса по результатам анализа контрольных карт;
- при значимых изменениях в условиях измерений (другая партия реагентов, новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.);
- при любых выявленных несоответствиях в работе лаборатории, применительно к методике выполнения измерений.

13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации антибиотиков группы тетрациклинов при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 11.1.

13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами оператор-время, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\overline{X_1}, \overline{X_2}$ согласно разделу 10, варьируя факторы промежуточной прецизионности (оператор, время) и обеспечивая контроль повторяемости по п. 11.1. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\overline{X_1}, \overline{X_2}$

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X_1} + \overline{X_2}}{2}, \tag{15}$$

при их соответствии условию (16)

$$\left|\overline{X_1} - \overline{X_2}\right| \le \mathrm{CD}_{\text{абс}}, \tag{16}$$

где $CD_{абс}$ – абсолютное значение критической разности, мг/кг, рассчитываемое по формуле

$$CD_{\text{абс}} = 0{,}01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \tag{17}$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 10, %.

13.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 10 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п.

Копирование документа разрешено только с разрешения собственника
Республика Беларусь
Общество с ограниченной ответственностью
Компания Альгимед
г. Минск
для документов

Рассчитывают среднее арифметическое значение $\overline{\overline{X}}$, мкг/кг, результатов измерений двух лабораторий $\bar{X}_1$ и $\bar{X}_2$ соответственно

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2} \quad (18)$$

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами измерений $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$, полученными в двух лабораториях, значение, которого сравнивают с абсолютным значением критической разности CD_R. Если выполняется условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_R, \quad (19)$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по формуле (18). может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Абсолютное значение критической разности CD_R, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$CD_R = 0.01 \cdot k \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}. \quad (20)$$

где $\overline{\overline{X}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений двух лабораторий. мкг/кг;

k – коэффициент, равный 1,3;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблице 10, 11.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами. полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 5 СТБ ИСО 5725-6.

Таблица 10 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании набора реагентов «MaxSignal ®для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Виды продукции	Предел повторяемости r, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{отн.}$, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	12	13	12
Молоко сухое	13	16	14
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	6	15	13
Масло сливочное, сыр, яйца	9	15	13
Творог	11	13	12
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки	15	22	19
Мед	10	14	12
Йогурт, кефир, сметана	16	17	16

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
Г.МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

Таблица 11 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик – тетрациклин»

Виды продукции	Предел повторяемости r, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	15	13	15
Йогурт, сметана, кефир, творог, молоко сухое	12	13	15
Сыр, яйца, масло сливочное	13	12	14
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки, мед	13	25	20

13.4 Контроль правильности

Контроль правильности определения массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением концентрации вещества (рабочая проба с добавкой).

Контроль правильности проводится с использованием добавок тетрациклина. Неопределенность аттестованного значения массовой концентрации тетрациклина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

13.4.1 ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавкой

Данные образцы для контроля представляют собой навеску пробы, массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в которой менее предела измерения данной МВИ, в которую внесена добавка раствора тетрациклина. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации тетрациклина X_{am} в пробе с добавкой рассчитывается по формуле

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \qquad (21)$$

где C_{ST} – концентрация раствора тетрациклина, нг/см^3;

V_{ST} – объем раствора тетрациклина, см^3;

m – масса навески пробы, г.

Примечание: принимается, что для сырого, пастеризованного, стерилизованного молока масса m численно равна объему аликвоты, см^3.

Величина массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Для внесения добавки используется раствор тетрациклина, приготовленный из тетрациклина гидрохлорида в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Допускается использовать для внесения добавок готовые spike-растворы, при условии, что относительная стандартная неопределенность добавленной массовой концентрации не превышает 3 %.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г. МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

13.4.2 Проведение контрольной процедуры

При проведении контрольной процедуры для мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок с использованием набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» получают серию из шести результатов измерений ОК в условиях повторяемости в соответствии с требованиями раздела 10 . При проведении контрольной процедуры для остальных видов продукции получают два результата измерений параллельных проб ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения, $\overline{X_K}$, мкг/кг, принимают:

- при проведении контрольной процедуры для мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок с использованием набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» – результат измерения массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в ОК, рассчитанный по формуле (22), при выполнении условия повторяемости по п. 11.1 с использованием вместо относительного предела повторяемости r, приведенного в таблице 10, значения $1{,}43 \cdot r$;
- при проведении контрольной процедуры в остальных случаях – результат измерения массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в ОК, рассчитанный по формуле (18) при выполнении условия повторяемости по п. 11.1.

$$\overline{X_K} = \frac{\sum_{i=1}^{6} X_i}{6}, \qquad (22)$$

где X_i - i-ый результат измерений ОК, мкг/кг.

Критерием приемлемости является условие

$$\left|\overline{X_K} - X_{am}\right| \le 0{,}01 \cdot K_{отн} \cdot X_{am}, \qquad (23)$$

где $K_{отн.}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 10, 11.

X_{am} – установленное значение массовой концентрации тетрациклина в ОК, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (23) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)

С помощью КК контролируют следующие показатели точности:

- повторяемость (R-карта или карта размахов);
- наличие смещения или правильность (Recovery-карта).

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [6] и СТБ ИСО 5725-6, раздел 6.

Для проверки стабильности соответствия результатов испытаний показателям повторяемости, установленным данной методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для построения КК используют показатели повторяемости в соответствии с таблицей 1.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

Примечание: При применении КК в течение длительного времени, для расчета границ КК могут быть использованы данные измерений, накопленные в процессе ведения и обработки КК. Однако соответствие результатов измерений требованиям данной методики может быть заявлено только в том случае, если показатель повторяемости, рассчитанный по накопленным лабораторией данным, статистически не превышает установленных методикой значений.

Для построения и ведения R-карт в качестве образцов для контроля (ОК) могут использоваться рабочие образцы.

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками раствора тетрациклина, приготовленного из тетрациклина гидрохлорида в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Предварительно установленная массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку тетрациклина в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

13.5.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1.128 \cdot \sigma_r, \tag{24}$$

где σ_r – относительное СКО повторяемости, %, приведенное в таблице 1.

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r \tag{25}$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r \tag{26}$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных X_1, X_2 при выполнении испытаний ОК в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой, расчета фактических относительных значений размаха W по формуле (27), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \tag{27}$$

где X_1, X_2 – значение результатов измерений в условиях повторяемости.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [6], п. 7.

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формулам (27), (28)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^{N} W_i / N}{d_2}, \tag{28}$$

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г.МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

где N – общее число измерений (точек) на КК, для получения значений центральной линии и границ необходимо, чтобы $N = 15..20$;
d_2 – коэффициент, d_2=1,128.

13.5.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

$$\overline{\mathrm{Re}c} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Re}c_i}{N}, \tag{29}$$

где N – количество измерений для расчета значений центральной линии и границ КК;
$\mathrm{Re}c_i$ – значение извлечения (Recovery), %, рассчитываемое по результатам i–го измерения пробы с добавкой тетрациклина, по формуле

$$\mathrm{Re}c_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \tag{30}$$

где X_i – массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в пробе с добавкой, полученное для i–го измерения, мкг/кг;
X_{exp} – рассчитанное значение массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в пробе с добавкой, мкг/кг.

- Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 2 \cdot S_{REC}, \tag{31}$$

- Границы регулирования

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 3 \cdot S_{REC} \tag{32}$$

где S_{REC} – стандартное отклонение извлечения, %, рассчитываемое по формуле

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} \left(\overline{\mathrm{Re}c} - \mathrm{Re}c_i\right)^2}{N-1}} \tag{33}$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений X_i при выполнении испытаний ОК в соответствии с МВИ, расчета фактических значений коэффициента извлечения $\mathrm{Re}c_i$ по формуле (30), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [6], п. 7.

14 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

ГОСТ 8.010–99 Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕС г. МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 24104–2001	Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 25336–82 Е	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498–90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике
ГОСТ 245-76	Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия
ГОСТ 10652-73	Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б). Технические условия
ГОСТ 4233-77	Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
ГОСТ 4234-77	Реактивы. Калий хлористый. Технические условия
ГОСТ 4328-77	Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия
ГОСТ 3118–77	Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
ГОСТ 4198-75	Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы. основные параметры и размеры
ГОСТ 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

Библиография

[1]	VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, V.J. Barwick and S.L.R. Ellison. LGC/VAM/1998/088
[2]	ISO 21748:2010 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения

Общество с ограниченной ответственностью Компания Альгимед г. Минск для документов

[3]	ТУ 2642-054-23050963-2008 Бумага индикаторная. Технические условия
[4]	ТУ 6-09-3375-78 н-Гексан
[5]	ТУ BY 191218537.007-2015 Набор реагентов для определения содержания антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа «ИФА антибиотик – тетрациклин»
[6]	ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Статистические методы. Контрольные карты Шухарта

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г. МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

gost.e-ecolog.ru