МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО СЕЛЬСКОМУ ХОЗЯЙСТВУ

УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

Орликов пер., д. 1/11, Москва, 107139
Для телеграмм: Москва 84
Тел./факс: (095) 975-51-05
E-mail: secmin@ud.mcx.ru
http://www.mcx.ru

11.10.2005 № 5-1-14/1005

На № _____

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления ветеринарии
Федерального агентства по сельскому хозяйству

_____ В.А. Авдькин

«_____» _____ 2005 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по количественному определению
антибактериальных препаратов в
продовольственном сырье и продуктах питания
животного происхождения методом
конкурентного иммуноферментного анализа

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3

А. Количественное определение левомицетина в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа 7

Б. Количественное определение тетрациклина в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа 25

В. Количественное определение стрептомицина в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа 40

Г. Количественное определение сульфаметазина в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа 56

Д. Количественное определение нитрофуранов в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа 76

Е. Количественное определение фторхинолонов в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа 87

ВВЕДЕНИЕ

Продовольственное сырье и пищевые продукты животного происхождения, реализуемые для потребления человеком, не должны содержать остатки некоторых антибактериальных препаратов (например, левомицетина, фторхинолонов и нитрофуранов).

Ветеринарные препараты, использующиеся в терапевтических целях (стрептомицин, пенициллин, тетрациклин, сульфаметазин), применяются под строгим государственным надзором и при условии обязательной выдержки животных перед забоем до полного вывода остатков ветеринарных препаратов из организма животного

Данные меры предпринимаются в развитых странах в связи с серьезной опасностью, которую представляют многие ветеринарные препараты для здоровья человека при их хроническом поступлении

Так, например, остатки антибактериальных препаратов, попадающие в пищевые продукты животного происхождения и далее, в организм человека, угнетают микрофлору кишечника, провоцируют дисбактериоз, проявления аллергического характера, вторичные грибковые инфекции, снижают сопротивляемость организма, могут провоцировать нарушения функции почек и кроветворных органов. Имеются сведения о гемотоксичности и канцерогенных свойствах некоторых сульфаниламидных препаратов, мутагенные и канцерогенные свойства обнаружены также у нитрофуранов.

Левомицетин (хлорамфеникол) обладает гемотоксическими свойствами и может вызвать аплазию костного мозга (потеря способности к кроветворению) и, вследствие этого, апластическую анемию, сопровождающуюся быстрым снижением уровня гемоглобина и эритроцитов в крови. При развитии явлений апластической анемии

молодые формы эритроцитов не обнаруживаются не только в крови, но и в пунктате костного мозга

Стрептомицин обладает ототоксичными и нефротоксичными свойствами, вызывает поражения слухового нерва (ототоксичность) и связанные с этим нарушения слуха и вестибулярные расстройства; при нарушениях функции почек возможны также нейротоксические явления.

Особенно чувствительны к стрептомицину лица, перенесшие неврит слухового нерва, инфаркт, страдающие стенокардией, гипертонией, болезнями печени и почек.

Потребление человеком продуктов, содержащих остаточные количества тетрациклинов, приводит к угнетению микрофлоры кишечника, может спровоцировать дисбактериоз, вторичные грибковые инфекции, проявления аллергического характера, вызвать тошноту, рвоту, расстройства функции кишечника, изменения слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, снижает сопротивляемость организма и повышает устойчивость патогенных микроорганизмов.

Особенно чувствительны к препаратам тетрациклиновой группы беременные, дети раннего возраста, лица, страдающие болезнями печени и почек.

Для определения остатков ветеринарных препаратов в продовольственном сырье и пищевых продуктах используются инструментальные физико-химические методы анализа, такие как жидкостная хроматография высокого давления (ВЭЖХ) и хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС). Эти методы, однако, предусматривают использование дорогостоящего оборудования, нуждающегося в высококвалифицированном обслуживании.

В последнее время для скрининга остатков ветеринарных препаратов применяется удобный и быстрый иммуноферментный метод анализа (ИФА, ELISA), являющийся официальным методом контроля

продуктов животного происхождения, принятым в странах Евросоюза (Директива 93/257/ЕЕС).

В основе иммуноферментного метода анализа лежит взаимодействие антигенов (определяемых антибактериальных препаратов) с антителами в лунках микротитровального полистиролового планшета.

Поставляемый планшет сенсибилизирован антителами «захвата», специфичными к антителам к тому или иному антибактериальному препарату (антигену).

Анализ выполняется следующим образом. Исследуемые (стандартные) образцы, препарат, содержащий антитела к определяемому антигену, и препарат, содержащий коньюгат антигена с ферментом, дозируются в лунки сенсибилизированного планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени свободные и коньюгированные молекулы антигена, конкурируя между собой, связываются антителами к антигену. В то же самое время при инкубации происходит иммуносорбция этих антител на поверхность лунок планшета за счет их взаимодействия с антителами «захвата» на поверхности.

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются свободные молекулы коньюгата.

После промывки планшета в его лунки дозируется раствор, содержащий субстрат и хромоген. В процессе инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени развития данной цветной реакции, в результате которой бесцветный хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на планшетном фотометре при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации определяемого антибактериального препарата в исследуемых образцах.

А. Количественное определение левомицетина в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор реагентов «RIDASCREEN® Хлорамфеникол» предназначен для количественного определения левомицетина в молоке, сухом молоке, меде, креветках, рыбной муке, мясе и яйцах методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA/ИФА). В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами.

1.1.Общие положения.

Поставляемый в комплекте набора планшет сенсибилизирован антителами «захвата», специфичными к антителам к левомицетину. Анализ выполняется следующим образом. Исследуемые (стандартные) образцы, препарат, содержащий антитела к левомицетину, и препарат, содержащий коньюгат левомицетина с ферментом, дозируются в лунки активированного планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы левомицетина и молекулы коньюгата левомицетина с ферментом, конкурируя между собой, связываются антителами к левомицетину. В то же самое время при инкубации происходит иммуносорбция этих антител на поверхность лунок планшета за счет их взаимодействия с антителами «захвата» на поверхности.

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются свободные молекулы коньюгата.

После промывки планшета в его лунки дозируется раствор, содержащий субстрат и хромоген. В процессе инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в

качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени развития данной цветной реакции, в результате которой бесцветный хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на планшетном фотометре при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации левомицетина в исследуемых образцах.

1.2. Реактивы и оборудование.

1.2.1. Средства измерения.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Меры массы по ГОСТ 7328.

Спектрофотометр (ридер), снабженный фильтром на 450 нм.

Дозаторы переменного объема на 50, 100, 250, 500 и 1000 мкл.

Цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 мл по ГОСТ 29227.

1.2.2. Вспомогательные устройства.

Центрифуга.

Шейкер типа "вортекс".

Лабораторный встряхиватель.

Гомогенизатор (Stomacher, Ultraturrax).

Микроиспаритель для испарения растворов досуха.

Магнитная мешалка.

Лабораторная посуда (стакан химический вместимостью 250 мл по ГОСТ 25336 или колба коническая со шлифом и притертой пробкой на 250 мл типа КН-1 по ТУ 92-891.029-91, воронки лабораторные типа В-36 или В-75 по ГОСТ 25336, стеклянный бюкс по ГОСТ 25336).

Разовые пипетки (пастерки).

Холодильник бытовой.

1.2.3. Реактивы и материалы.

Дистиллированная вода.

Этилацетат.

Изооктан/хлороформ (2/3).

Осадитель 1 (Каррез 1) - 0.36 М раствор ферроцианида (II) калия х 3 H_2O (1,52 г растворить в 10 мл дистиллированной воды).

Осадитель 2 (Каррез 2) - 1.04 М раствор сульфата цинка х 7 H_2O (2,99 г растворить в 10 мл дистиллированной воды).

В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 определений (включая калибровку по стандартным растворам).

Набор содержит:

Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), сенсибилизированных антителами «захвата» -1 шт.

Комплект стандартных растворов левомицетина со следующими концентрациями: 0 нг/л, 500 нг/л, 1500 нг/л, 4500 нг/л, 13500 нг/л, 40500 нг/л, в буферном растворе, концентрат, по 1,3 мл – 6 х 1 шт.

Коньюгат левомицетина с пероксидазой, концентрат, 0,7 мл: красная крышка – 1 шт.

Антитела к левомицетину, концентрат, 0,7 мл: черная крышка – 1 шт.

Субстрат, содержит пероксид карбамида, 7 мл: зеленая крышка – 1 шт.

Хромоген, содержит тетраметилбензидин, 7 мл: голубая крышка – 1 шт.

Стоп-реагент, содержит 1 N серную кислоту, 14 мл: желтая крышка – 1 шт.

Буфер 1, для разбавления стандартных растворов, коньюгата, антител, растворов образцов и буфера 2, 100 мл – 1 шт.

Буфер 2, для разбавления стандартных образцов при анализе молока, конц., 1 мл – 1 шт.

Режим хранения.

Храните набор при температуре 2 - 8°С. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ НАБОР.

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в оригинальный фольгированный пакет вместе с имеющимся осушителем и плотно закройте пакет.

Поскольку раствор хромогена светочувствителен, избегайте попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором.

Признаки порчи реагентов.

В случае окрашивания раствора хромогена не рекомендуется использовать раствор, поскольку окрашивание раствора хромогена является признаком его порчи.

В случае, если величина оптической плотность, измеренной в лунке с нулевым стандартом, не превышает 0.6, это также может быть признаком порчи реагентов.

2. МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

2.1. Отбор проб и подготовка к проведению исследований.

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб.

Пробы доставляют в лабораторию и хранят в холоде в темном месте.

2.1.1. Молоко (только обезжиривание).

- перенесите пробу молока (например, 5 мл) в стеклянную центрифужную пробирку;
- центрифугируйте при 4 - 12°C в течение 15-ти минут при 3000 g (если у Вас нет центрифуги с охлаждением, охладите пробы до 8°C перед центрифугированием);
- удалите верхний жирный слой и перенесите аликвоту обезжиренного молока в новую чистую пробирку;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

Фактор разбавления	1
Предел обнаружения	50 нг/л
Предел количественного определения	150 нг/л

Примечание: при приготовлении стандартных растворов используйте буфер 2 (см. п. 2.2.5)

Обратите внимание на примечания в конце раздела 2.1.4!

2.1.2. Молоко.

- перенесите 5 мл молока в стеклянную центрифужную пробирку;
- добавьте в пробирку 250 мкл осадителя 1 и 250 мкл осадителя 2;

- тщательно перемешайте (например, на вортексе) и центрифугируйте при 4 - 12°С в течение 10-ти минут при 3000 g (если у Вас нет центрифуги с охлаждением, охладите пробы до 8°С перед центрифугированием);
- перенесите 2,2 мл супернатанта (соответствует 2 мл молока) в чистую пробирку;
- добавьте в пробирку 4 мл этилацетата и экстрагируйте встряхиванием в течение 10 мин;
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g;
- перенесите 2 мл экстракта (соответствует 1 мл молока) в новую чистую пробирку и испарите экстракт досуха при 60 °С в слабом токе азота;
- растворите сухой остаток в 250 мкл буфера 1 и тщательно перемешайте на вортексе;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

Фактор разбавления	0,25
Предел обнаружения	12,5 нг/л
Предел количественного определения	37,5 нг/л

Обратите внимание на примечания в конце раздела 2.1.4!

2.1.3. Сухое молоко.

- взвесьте в центрифужной стеклянной пробирке 2 г сухого молока, добавьте 10 мл дистиллированной воды и встряхивайте пробирку до растворения пробы;
- добавьте в пробирку по 1 мл осадителя 1 и осадителя 2;
- тщательно перемешайте (например, на вортексе) и центрифугируйте при 4 - 12°С в течение 10-ти минут при 3000 g (если у Вас нет

центрифуги с охлаждением, охладите пробы до 8°С перед центрифугированием);

- перенесите 3,6 мл супернатанта (соответствует 0,6 г сухого молока) в чистую пробирку;
- добавьте в пробирку 6 мл этилацетата и экстрагируйте встряхиванием в течение 10 мин;
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g;
- перенесите 4 мл эфирного экстракта (соответствует 0,4 г сухого молока) в новую чистую пробирку и испарите экстракт досуха при 60 °С в слабом токе азота;
- растворите сухой остаток в 400 мкл буфера 1 и тщательно перемешайте на вортексе;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

Фактор разбавления	1
Предел обнаружения	50 нг/л
Предел количественного определения	150 нг/л

Обратите внимание на примечания в конце раздела 2.1.4!

2.1.4. Мед .

- взвесьте в центрифужной стеклянной пробирке 2 г меда, добавьте 4 мл дистиллированной воды и встряхивайте пробирку до растворения пробы;
- добавьте в пробирку 4 мл этилацетата и экстрагируйте встряхиванием по оси «вверх-вниз» в течение 10 мин;
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g;

- перенесите 1 мл эфирного экстракта (соответствует 0,5 г меда) в новую чистую пробирку и испарите экстракт досуха при 60 °С в слабом токе азота;
- растворите сухой остаток в 0,5 мл буфера 1 и тщательно перемешайте на вортексе;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

Фактор разбавления	1
Предел обнаружения	50 нг/л
Предел количественного определения	150 нг/л

Сухой остаток после испарения эфирного экстракта не растворяется полностью в буфере 1. Однако, тем не менее, экспериментальная оценка степени извлечения левомицетина показала удовлетворительный результат – более 80%

Примечания:

При исследовании некоторых проб, не содержащих левомицетина, наблюдается матричный эффект, иногда в области концентраций между вторым и третьим стандартами.

В силу возможного матричного эффекта, при исследовании проб по пп.2.1.1 –2.1.4. рекомендуется интерпретировать результаты анализа как положительные, если найденная по калибровке концентрация левомицетина превышает концентрацию третьего стандарта.

ВНИМАНИЕ:

При выполнении пробоподготовки по пп.2.1.5 и 2.1.6 холостые пробы могут показывать положительный результат на уровне 2-го стандарта. При расчете концентрации левомицетина в исследуемых пробах рекомендуется учитывать фоновый сигнал с помощью постановки холостого опыта. Для

этого в каждой серии анализов полезно выполнять испарение 4 мл чистого этилацетата и далее следовать описанной стандартной процедуре. Измеренный фоновый сигнал далее следует вычитать на стадии обработки результатов.

2.1.5. Креветки, мясо и рыбная мука.

- гомогенизируйте представительную пробу (например, 100 г) в гомогенизаторе, блендере или миксере;
- взвесьте в стеклянной центрифужной пробирке 3 г гомогената, смешайте с 3 мл дистиллированной воды и добавьте 6 мл этилацетата;
- интенсивно встряхивайте пробирку по оси «вверх-вниз» в течение 10 мин
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g;
- перенесите 4 мл эфирного экстракта (соответствует 2 г пробы) в новую чистую пробирку и испарите экстракт досуха при 60 °С в слабом токе азота;
- растворите сухой остаток в 1 мл смеси изооктана с хлороформом (2/3) и тщательно перемешайте на вортексе;
- добавьте к раствору 0,5 мл буфера 1 и интенсивно перемешивайте на вортексе в течение одной минуты;
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g или более высоком ускорении;
- для анализа используйте 50 мкл раствора (водный верхний слой*) на лунку планшета;

Фактор разбавления	0,25
Предел обнаружения	12,5 нг/л
Предел количественного определения	37,5 нг/л

*) в случае образования пены или геля в межфазовой зоне при недостаточном объеме водной фазы, поместите пробирку на 5 минут в водяную баню при температуре 80°С и затем еще раз отцентрифугируйте.

2.1.6. Яйца.

- гомогенизируйте представительную пробу (например, 100 г) в гомогенизаторе, блендере или миксере;
- взвесьте в стеклянной центрифужной пробирке 2 г гомогената, смешайте с 12 мл этилацетата;
- интенсивно встряхивайте пробирку по оси «вверх-вниз» в течение 10 мин
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g;
- перенесите 6 мл эфирного экстракта (соответствует 1 г пробы) в новую чистую пробирку и испарите экстракт досуха при 60 °С в слабом токе азота;
- растворите сухой остаток в 1 мл смеси изооктана с хлороформом (2/3) и тщательно перемешайте на вортексе;
- добавьте к раствору 1 мл буфера 1 и интенсивно перемешивайте на вортексе в течение одной минуты;
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g или более высоком ускорении;
- для анализа используйте 50 мкл раствора (водный верхний слой*) на лунку планшета;

Фактор разбавления	1
Предел обнаружения	50 нг/л
Предел количественного определения	150 нг/л

*) в случае образования пены или геля в межфазной зоне при недостаточном объеме водной фазы, поместите пробирку на 5 минут в водяную баню при температуре 80°С и затем еще раз отцентрифугируйте

Примечание: по запросу предоставляются методики для определения левомицетина в сыворотке крови, комбикормах и моче (глюкорониды левомицетина)

2.2. Порядок проведения измерений.

Предварительные замечания по проведению измерений.

- ✓ Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной.
- ✓ Немедленно после использования охлаждают все оставшиеся реагенты до температуры 2 - 8°С.
- ✓ В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета.
- ✓ Воспроизводимость результатов анализа существенно зависит от тщательности отмывки колонки в процессе пробоподготовки. Внимательно следуют описанной процедуре отмывки колонки.
- ✓ На всех стадиях инкубации избегайте воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет непрозрачным экраном.

2.2.1. Приготовление раствора коньюгата

Коньюгат левомицетина с ферментом (флакон с красной крышкой) поставляется в концентрированном виде. Поскольку разбавленный раствор коньюгата имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Перед разбавлением концентрированного раствора коньюгата осторожно встряхните содержимое флакона. Для приготовления готового к

использованию раствора коньюгата разбавьте концентрат коньюгата буферным раствором №1, имеющимся в комплекте набора, в отношении 1:11 (например, смешайте 200 мкл концентрата коньюгата с 2 мл буфера - данного разведения достаточно для 4-х стрипов)

2.2.2. Приготовление раствора антител.

Антитела к левомицетину (флакон с черной крышкой) поставляются в концентрированном виде. Поскольку разбавленный раствор антител имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Перед разбавлением концентрата антител осторожно встряхните содержимое флакона. Для приготовления готового раствора антител разбавьте концентрат буферным раствором №1, имеющимся в комплекте набора, в отношении 1:11 (например, смешайте 200 мкл концентрата антител с 2 мл буфера №1 - данного разведения достаточно для 4-х стрипов).

2.2.3. Приготовление буферного раствора №2 (только для проб молока).

Для приготовления готового буферного раствора №2, использующегося при исследовании проб молока, разбавьте концентрат буфера №2 (флакон с белой крышкой) 9 мл буферного раствора №1 и энергично перемешайте, (например, с помощью встряхивателя типа «вортекс»), периодически подогревая раствор до 40°С. Мутность раствора не влияет на результат определения, однако осадок на дне флакона после перемешивания должен равномерно распределяться в объеме раствора.

2.2.4. Микротитровальный планшет, сенсибилизированный антителами.

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов.

Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8 °С.

2.2.5. Стандартные растворы.

Для приготовления готовых к использованию стандартных растворов левомицетина концентрированные растворы, входящие в состав набора, следует разбавить буфером №1 (или буфером 2) в указанной пропорции.

Не используйте пластиковую посуду, для разбавления рекомендуется использовать только *стеклянную посуду*!

После разбавления тщательно перемешайте готовые растворы.

Для каждой серии исследований следует готовить свежие стандартные растворы.

Стандарт 1: 50 мкл концентрата №1+ 450 мкл буферного раствора №1* 0 нг/л

Стандарт 2: 50 мкл концентрата №2 + 450 мкл буферного раствора №1* 50 нг/л

Стандарт 3: 50 мкл концентрата №3+ 450 мкл буферного раствора №1* 150 нг/л

Стандарт 4: 50 мкл концентрата №4+ 450 мкл буферного раствора №1* 450 нг/л

Стандарт 5: 50 мкл концентрата №5+ 450 мкл буферного раствора №1* 1350 нг/л

Стандарт 6: 50 мкл концентрата №6+ 450 мкл буферного раствора №1* 4050 нг/л

* *При исследовании образцов молока для разведения стандартов используйте буферный раствор №2.*

2.2.6. Процедура анализа.

1. Вставьте в рамку планшета лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Запишите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов. Пример формы записи приведен на Рис. 1.

С1	С1	П3	П3	П11	П11	П19	П19	П27	П27	П35	П35
С2	С2	П4	П4	П12	П12	П20	П20	П28	П28	П36	П36
С3	С3	П5	П5	П13	П13	П21	П21	П29	П29	П37	П37
С4	С4	П6	П6	П14	П14	П22	П22	П30	П30	П38	П38
С5	С5	П7	П7	П15	П15	П23	П23	П31	П31	П39	П39
С6	С6	П8	П8	П16	П16	П24	П24	П32	П32	П49	П49
П1	П1	П9	П9	П17	П17	П25	П25	П33	П33	П41	П41
П2	П2	П10	П10	П18	П18	П26	П26	П34	П34	П42	П42

Рисунок 1. Пример формы записи координат лунок перед выполнением анализа (С-стандарты, П-пробы).

2. Добавьте по 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок

3. Добавьте по 50 мкл разбавленного раствора коньюгата на донышко каждой лунки.

4. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл готового разбавленного раствора антител. Перемешайте вручную, соблюдая осторожность, и оставьте на инкубацию в течение 2-х часов при комнатной температуре (20 – 25°С).

5. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку планшета и выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполните лунки 250 мкл дистиллированной воды и снова вылейте воду. Выбейте капельки воды, как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок водой еще два раза.

6. Добавьте по 50 мкл субстрата и по 50 мкл хромогена в каждую лунку. Перемешайте вручную, соблюдая осторожность, и инкубируйте при комнатной температуре (20 – 25°С) в течение 30 минут в темноте.

7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и хорошо перемешайте вручную. В течение 60-ти минут после добавления стоп-

реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм ("бланк" или нулевое считывание по воздуху).

2.2.7. Обработка результатов измерения.

Средние значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами, делятся на среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

$$\frac{\text{Оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\text{поглощения}} \times 100 = \%$$

Оптическая плотность лунки с нулевым стандартом

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации левомицетина в нг/кг строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат. Калибровочная кривая должна быть почти линейна в диапазоне 50 - 1350 нг/кг (см. Рис. 2).

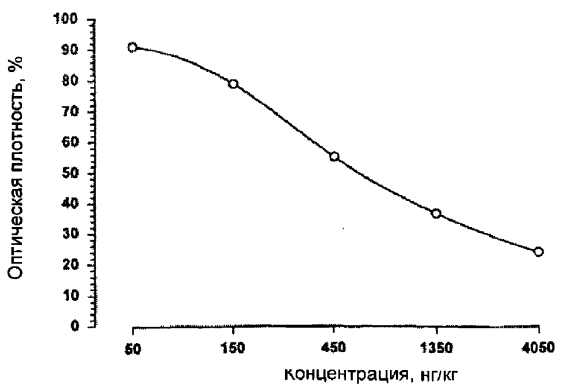

Рисунок 2. Пример калибровочной кривой при определении левомицетина

Концентрация левомицетина в исследуемых растворах в нг/кг (или нг/л, ppt) считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов.

Внимание:

Для того чтобы вычислить концентрацию левомицетина в исследуемой исходной пробе, величину концентрации левомицетина, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления (см. п. 9.1. – 9.6.)

Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение, например, RIDA® SOFT. При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения и рекомендациями разработчика.

2.2.8. Чувствительность.

Предел обнаружения левомицетина в экстрактах с помощью набора «RIDASCREEN® Хлорамфеникол» составляет 50 нг/кг (ppt) по калибровочной кривой. Пределы обнаружения левомицетина в различных образцах, данные с учетом фактора разбавления, приведены в соответствующих разделах методики.

2.2.9. Специфичность.

Специфичность набора реагентов «RIDASCREEN® Хлорамфеникол» оценивали путем измерения перекрестной чувствительности к следующим веществам:

Перекрестная чувствительность:	Левомицетин	100%
	Левомицетин основной	0.5%
	Тиамфеникол	< 0.05%
	Нет чувствительности к тетрациклинам, гентамицину, ампициллину и флорфениколу	

2.2.10. Воспроизводимость.

Воспроизводимость результата измерения внутри серии оценивали по трем параллельным экспериментам. Значения коэффициента вариации (относительного стандартного отклонения) во всем диапазоне измерения достаточно невелики, что позволяет гарантировать высокую воспроизводимость результата определения.

2.2.11. Степень извлечения.

Степень извлечения левомицетина при работе по настоящей методике составляет более 80% для всех указанных проб.

Б. Количественное определение тетрациклина в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

1. ПРИНЦИП МЕТОДА.

Набор реагентов «RIDASCREEN® Тетрациклин» предназначен для количественного определения тетрациклина в мясе, молоке и меде методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA/ИФА). В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами.

1.1.Общие положения.

На поверхности планшета, поставляемого в комплекте набора, адсорбирован особым образом приготовленный препарат тетрациклина (коньюгат с белком).

Анализ выполняется следующим образом. В лунки планшета дозируются исследуемые (стандартные) образцы и раствор, содержащий антитела к тетрациклину. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы тетрациклина, содержащиеся в пробе или в стандартном растворе и молекулы тетрациклина на поверхности планшета, конкурируя между собой, связываются антителами к тетрациклину.

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются все несвязанные поверхностью антитела.

На следующей стадии в лунки добавляются вторичные антитела, коньюгированные с ферментом (коньюгат), которые в процессе последующей инкубации взаимодействуют с антителами к тетрациклину, уже сорбированными поверхностью на предыдущей стадии анализа.

После очередной промывки планшета в его лунки дозируется раствор субстрата (пероксид карбамида) и раствор хромогена (тетраметилбензидин). В процессе инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени развития данной цветной реакции в результате которой бесцветный хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора после добавления стоп-реагента меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на планшетном фотометре при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации тетрациклина в исследуемых образцах.

1.2. Реактивы и оборудование.

1.2.2. Средства измерения.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Меры массы по ГОСТ 7328.

Спектрофотометр (ридер), снабженный фильтром на 450 нм.

Дозаторы переменного объема на 50, 100, 250, 500 и 1000 мкл.

Цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 мл по ГОСТ 29227.

1.2.2. Вспомогательные устройства.

Центрифуга.

Шейкер типа "вортекс".

Лабораторный встряхиватель.

Гомогенизатор (Stomacher, Ultraturrax).

Микроиспаритель для испарения растворов досуха.

Устройство для твердофазной экстракции (мясо).

Колонки для твердофазной экстракции RIDA® C18

Ультразвуковая баня (для меда).

Фильтровальная бумага.

Лабораторная посуда (стакан химический вместимостью 250 мл по ГОСТ 25336 или колба коническая со шлифом и притертой пробкой на 250 мл типа КН-1 по ТУ 92-891.029-91, воронки лабораторные типа В-36 или В-75 по ГОСТ 25336, стеклянный бюкс по ГОСТ 25336).

Разовые пипетки (пастерки).

Холодильник бытовой.

1.2.3. Реактивы и материалы.

Дистиллированная вода.

Моющий фосфатный буфер с твином (0,55 г NaH_2PO_4 x H_2O + 2,85 г Na_2HPO_4 x $2H_2O$ + 9 г NaCl + 1 мл твина 20 растворить в дистиллированной воде и довести до объема 1000 мл); pH 7,2 – 7,4

При исследовании образцов мяса:

Метанол

Буфер Макллвейна (12,9 г лимонной кислоты моногидрата + 10,9 г Na_2HPO_4 + 37,2 ЭДТА-натриевой соли растворить в дистиллированной воде и довести до объема 1000 мл); pH 3,8

Раствор 20мМ щавелевой кислоты в метаноле (1,8 г/л)

При исследовании образцов меда:

20 мМ фосфатный буфер (0,55 г NaH_2PO_4 x H_2O + 2,85 г Na_2HPO_4 x $2H_2O$ + 9 г NaCl растворить в дистиллированной воде подстроить pH до 7,4 с помощью раствора NaOH и довести до объема 1000 мл);

В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 определений (включая калибровку по стандартным растворам).

Набор содержит:

Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), сенсибилизированных антителами «захвата» -1 шт.

Комплект стандартных растворов тетрациклина со следующими концентрациями: 0 мкг/л, 0,5 мкг/л, 1,5 мкг/л, 4,5 мкг/л, 13,5 мкг/л, 40,5 мкг/л, в буферном растворе, концентрат, по 1,3 мл – 6 х 1 шт.

Коньюгат тетрациклина с пероксидазой, поставляется готовым для использования, 10 мл: красная крышка – 1 шт.

Антитела к тетрациклину, поставляется готовым для использования, 6 мл: черная крышка – 1 шт.

Субстрат, содержит пероксид карбамида, 7 мл: зеленая крышка – 1 шт.

Хромоген, содержит тетраметилбензидин, 7 мл: голубая крышка – 1 шт.

Стоп-реагент, содержит 1 N серную кислоту, 14 мл: желтая крышка – 1 шт.

Буфер 1, для разбавления стандартных растворов и растворов образцов 50 мл – 1 шт.

Буфер 2, для разбавления стандартных образцов при анализе молока, конц., 10 мл – 1 шт.

Режим хранения.

Храните набор при температуре 2 - 8°С. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ НАБОР.

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в оригинальный фольгированный пакет вместе с имеющимся осушителем и плотно закройте пакет.

Поскольку раствор хромогена светочувствителен, избегайте попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором.

Признаки порчи реагентов.

В случае окрашивания раствора хромогена не рекомендуется использовать раствор, поскольку окрашивание раствора хромогена является признаком его порчи.

В случае, если величина оптической плотность, измеренной в лунке с нулевым стандартом, не превышает 0.6, это также может быть признаком порчи реагентов.

2. МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

2.1. Отбор проб и подготовка к проведению исследований.

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб.

Пробы доставляют в лабораторию и хранят в холоде в темном месте.

2.1.1. Жирное молоко.

- центрифугируйте пробу молока для обезжиривания при 10°С в течение 10-ти минут при 3000 g (если у Вас нет центрифуги с охлаждением, охладите пробы до 8°С перед центрифугированием);
- удалите верхний жирный слой и перенесите аликвоту обезжиренного молока в новую чистую пробирку;
- смешайте пробу молока с буфером 1 в отношении 1:10 (например, 50 мкл и 450 мкл буфера) в стеклянную центрифужную пробирку;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

2.1.2. Молоко (Обезжиренное молоко)

- смешайте пробу обезжиренного молока с буфером 1 в отношении 1:10, например, смешайте50 мкл молока и 450 мкл буфера;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета.

ПРИМЕЧАНИЕ: по запросу предоставляется также методика определения тетрациклина в сухом молоке.

2.1.3. Мясо.

- гомогенизируйте пробу мяса (используйте миксер, стомахер или ультратюрракс);

- взвесьте 5 г гомогенизата, смешайте с 25 мл буфера Макллвейна и встряхивайте в течение 30 мин;

- центрифугируйте раствор при 15°С в течение 10-ти минут при 4000g;

- отберите верхний слой и повторите экстракцию с 25 мл буфера Макллвейна;

- объедините супернатанты (50 мл) и профильтруйте раствор через гофрированный фильтр;

- отберите 5 мл фильтрата и очистите раствор методом твердофазной экстракции на колонке RIDA® C18.

Очистка раствора методом твердофазной экстракции.

- с помощью устройства для твердофазной экстракции (вакуумного манифолда), руководствуясь инструкцией по его эксплуатации, промойте колонку 3 мл метанола со скоростью 1 капля в секунду. При отсутствии устройства для твердофазной экстракции для создания давления воздуха на входе в колонку используйте пластиковый шприц на 20 мл с резиновой пробкой, соединенный с колонкой через стеклянный буферный цилиндр и пластиковый переходник;

- промойте колонку 2 мл дистиллированной воды со скоростью 1 капля в секунду;

- пропустите через колонку 5 мл подготовленного раствора исследуемой пробы со скоростью 15 капель в минуту;

- промойте колонку 3 мл дистиллированной воды со скоростью 1 капля в секунду;

- удалите из колонки остатки жидкости и просушите колонку в токе воздуха или азота 2 мин;

- адсорбированные на колонке вещества осторожно, со скоростью 15 капель в минуту, элюируют 2 мл 20 мМ раствора щавелевой кислоты в метаноле в чистую пробирку;

- разбавьте элюат буфером 1 в отношении 1:10 (1 + 9), например, смешайте 50 мкл элюата и 450 мкл буфера 1;
- для анализа используют 50 мкл раствора.

2.2. Порядок проведения измерений.

Предварительные замечания по проведению измерений

- Перед использованием набора доведите температуру всех реагентов до комнатной.
- Немедленно после использования охладите все оставшиеся реагенты до температуры 2 - 8°С.
- В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания лунок планшета.
- Воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. Внимательно следуйте описанной далее процедуре отмывки планшета.
- На всех стадиях инкубации избегайте воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет крышкой.

2.2.1. Приготовление раствора антител.

Раствор антител к тетрациклину (флакон с черной крышкой) поставляется готовым для использования.

2.2.2.Приготовление раствора коньюгата.

Раствор коньюгата с ферментом (флакон с красной крышкой) поставляется готовым для использования.

2.2.3.Микротитровальный планшет, сенсибилизированный препаратом тетрациклина.

Фольгированная упаковка планшета открывается со стороны застежки.

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов вместе с рамкой.

Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8 °С.

2.2.4.Стандартные растворы.

Для приготовления готовых к использованию стандартных растворов тетрациклина концентраты растворов, входящие в состав набора, следует разбавить буфером №1* в следующей пропорции. После разбавления тщательно перемешайте готовые растворы. Не используйте пластиковую посуду, для разбавления рекомендуется использовать стеклянную посуду.

Стандарт 1: 50 мкл концентрата №1+ 450 мкл буферного раствора №1* 0 мкг/л

Стандарт 2: 50 мкл концентрата №2 + 450 мкл буферного раствора №1* 0,050 мкг/л

Стандарт 3: 50 мкл концентрата №3+ 450 мкл буферного раствора №1* 0,150 мкг/л

Стандарт 4: 50 мкл концентрата №4+ 450 мкл буферного раствора №1* 0,450 мкг/л

Стандарт 5: 50 мкл концентрата №5+ 450 мкл буферного раствора №1* 1,350 мкг/л

Стандарт 6: 50 мкл концентрата №6+ 450 мкл буферного раствора №1* 4,050 мкг/л

Для каждой серии исследований следует готовить свежие стандартные растворы.

** При исследовании образцов молока для разведения используйте буферный раствор №2!*

Перед использованием буфера 2 гомогенизируйте раствор с помощью вортекса.

2.2.5. Процедура анализа.

1. Вставьте в рамку планшета лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Запишите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов.

Пример формы записи приведен на Рис. 1.

2. Добавьте по 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок.

3. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл раствора антител. Тщательно перемешайте вручную и оставьте на инкубацию в течение 1-го часа при комнатной температуре (20 - 25°С).

4. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполните лунки 250 мкл раствора моющего фосфатного буфера и снова опорожните лунки. Выбейте капельки жидкости как описано выше.

5. Повторите процедуру промывки лунок раствором фосфатного буфера еще два раза.

6. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл раствора коньюгата. Тщательно перемешайте вручную и оставьте на инкубацию в течение 15-ти минут при комнатной температуре (20 - 25°С).

7. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной

бумагой. Наполните лунки 250 мкл раствора фосфатного буфера и снова опорожните лунки. Выбейте капельки жидкости как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок раствором фосфатного буфера еще два раза.

8. Добавьте по 50 мкл субстрата и по 50 мкл хромогена в каждую лунку. Тщательно перемешайте и инкубируйте при комнатной температуре (20 - 25°С) в течение 15 минут в темноте.

9. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и осторожно перемешайте вручную. В течение 60-ти минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм ("бланк" или нулевое считывание по воздуху).

2.2.6. Обработка результатов измерения.

Средние значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

$$\frac{\text{оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\text{оптическая плотность лунки с нулевым стандартом}} \times 100 = \%\ \text{поглощения}$$

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации тетрациклина в мкг/л (ppb) строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат. Калибровочная кривая должна быть почти линейна в диапазоне 0,150 – 1,350 мкг/л (см. Рис. 3).

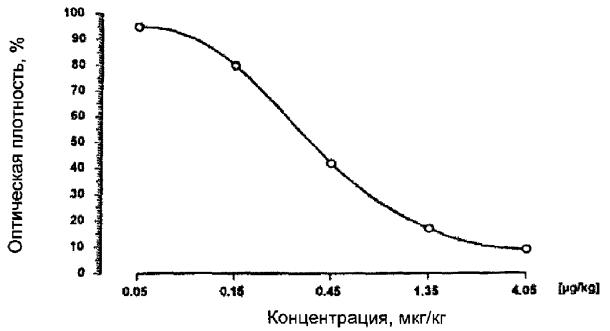

Рисунок 3. Пример калибровочной кривой при определении тетрациклина

Концентрация тетрациклина в исследуемых растворах в мкг/л (ppb) считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов.

Внимание:

Для того чтобы вычислить концентрацию тетрациклина в исследуемой исходной пробе, величину концентрации тетрациклина, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

Молоко (тетрациклин, хлортетрациклин)	10
Молоко (окситетрациклин)	100

Мясо (тетрациклин, хлортетрациклин)	40
Мясо (окситетрациклин)	400
Мед (тетрациклин, хлортетрациклин)	50
Мед (окситетрациклин)	500

2.2.7. Чувствительность.

В среднем предел обнаружения тетрациклина с помощью набора «RIDASCREEN® Тетрациклин» составляет 0.05 мкг/кг (мкг/л). С учетом фактора разбавления предел обнаружения составляет 1,5 мкг/л тетрациклина или 15 мкг/л окситетрациклина в молоке. Предел обнаружения тетрациклина в мясе составляет около 6 мкг/кг, окситетрациклина – 60 мкг/кг. Предел обнаружения тетрациклина в меде составляет около 15 мкг/кг, окситетрациклина – 150 мкг/кг.

2.2.8.Специфичность.

Специфичность набора реагентов «RIDASCREEN® Тетрациклин» оценивали путем измерения перекрестной чувствительности набора к следующим веществам:

Перекрестная чувствительность:	Тетрациклин	100%
	Миноциклин	125%
	Ролитетрациклин	110%
Перекрестная чувствительность:	Хлортетрациклин	100%
	Демеклоциклин	35%
	Окситетрациклин	10%
	Доксициклин	5%

2.2.9. Воспроизводимость.

Воспроизводимость результата измерения внутри серии оценивали по трем параллельным экспериментам. На Рис.3 дана оценка воспроизводимости результата на одном планшете для разных концентраций тетрациклина. Как видно, значения коэффициента вариации (относительного стандартного отклонения) во всем диапазоне измерения достаточно невелики, что позволяет гарантировать высокую воспроизводимость результата определения.

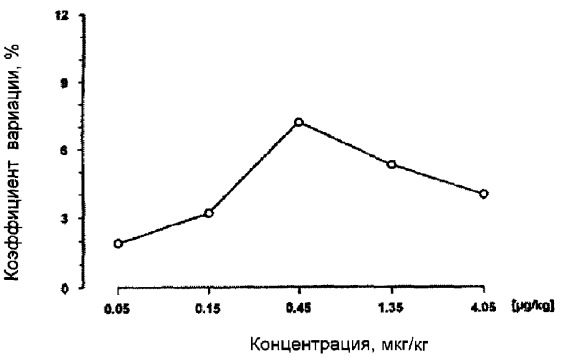

Рисунок 4. Зависимость коэффициента вариации, оцененного для набора «RIDASCREEN® Тетрациклин», от измеряемой концентрации тетрациклина.

2.2.10. Степень извлечения

При искусственном загрязнении проб молока 5 мкг/л тетрациклина или 100 мкг/л окситетрациклина степень извлечения составила 90% (± 17%). Степень извлечения тетрациклина из меда составила 95% (± 16%), из мяса - 100% (± 15%)

B. Количественное определение стрептомицина в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор реагентов «RIDASCREEN® Стрептомицин» предназначен для количественного определения стрептомицина и дигидрострептомицина в мясе, печени, меде и молоке методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA/ИФА).

В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами.

1.1.Общие положения.

Поставляемый в комплекте набора планшет сенсибилизирован «антителами захвата», специфичными к антителам к стрептомицину. Анализ выполняется следующим образом. Исследуемые (стандартные) образцы, раствор, содержащий антитела к стрептомицину и раствор, содержащий коньюгат стрептомицина с ферментом, дозируются в лунки активированного планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы стрептомицина, содержащиеся в пробе или в стандартном растворе и молекулы коньюгата стрептомицина с ферментом, конкурируя между собой, связываются антителами к стрептомицину. В то же самое время происходит взаимодействие «антител захвата» на подложке планшета с антителами к стрептомицину.

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются свободные молекулы коньюгата.

После промывки планшета в его лунки дозируется раствор субстрата (пероксид карбамида) и раствор хромогена (тетраметилбензидин). В процессе инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени

развития данной цветной реакции, в результате которой бесцветный хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора после добавления стоп-реагента меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на планшетном фотометре при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации стрептомицина в исследуемых образцах.

1.2. Реактивы и оборудование.

1.2.3. Средства измерения.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Меры массы по ГОСТ 7328.

Спектрофотометр (ридер), снабженный фильтром на 450 нм.

Дозаторы переменного объема на 50, 100, 250, 500 и 1000 мкл.

Цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 мл по ГОСТ 29227.

1.2.2. Вспомогательные устройства.

Центрифуга.

Шейкер типа "вортекс".

Лабораторный встряхиватель.

Гомогенизатор (Stomacher, Ultraturrax).

Лабораторная посуда (стакан химический вместимостью 250 мл по ГОСТ 25336 или колба коническая со шлифом и притертой пробкой на 250 мл типа КН-1 по ТУ 92-891.029-91, воронки лабораторные типа В-36 или В-75 по ГОСТ 25336, стеклянный бюкс по ГОСТ 25336).

Разовые пипетки (пастерки).

Холодильник бытовой.

1.2.3. Реактивы и материалы.

Дистиллированная вода.

Н-Гексан.

Осадитель 1 (Каррез 1) - 0.36 М раствор ферроцианида (II) калия х 3 H_2O (1,52 г растворить в 10 мл дистиллированной воды).

Осадитель 2 (Каррез 2) - 1.04 М раствор сульфата цинка х 7 H_2O (2,99 г растворить в 10 мл дистиллированной воды).

для молока и мяса:

Фосфатный буфер с твином (0,55 г NaH_2PO_4 х H_2O + 2,85 г Na_2HPO_4 х $2H_2O$ + 9 г NaCl + 1 мл твина 20 растворить в дистиллированной воде и довести до объема 1000 мл); pH 7,2 – 7,4

для меда:

Фосфатный буфер (0,55 г NaH_2PO_4 х H_2O + 2,85 г Na_2HPO_4 х $2H_2O$ + 9 г NaCl растворить в дистиллированной воде и довести до объема 1000 мл).

Экстрагирующий буфер: 2 г (= 50 мМ) натриевой соли гептан-сульфоновой кислоты + 1,9 г (= 25 мМ) фосфата натрия Na_3PO_4 х $12H_2O$, растворить в воде, довести до объема 200 мл, с помощью ортофосфорной кислоты подстроить pH до 2.0!

В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 определений (включая калибровку по стандартным растворам).

Набор содержит:

Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), сенсибилизированных антителами «захвата» -1 шт.

Комплект стандартных растворов стрептомицина со следующими концентрациями: 0 мкг/л, 5 мкг/л, 20 мкг/л, 80 мкг/л, 320 мкг/л, 1280 мкг/л, *в буферном растворе, концентрат, по 1,3 мл – 6 х 1 шт.*

Коньюгат стрептомицина с пероксидазой, концентрат, 0,7 мл: красная крышка – 1 шт

Антитела к стрептомицину, концентрат, 0,7 мл: черная крышка – 1 шт.

Субстрат, содержит пероксид карбамида, 7 мл: зеленая крышка – 1 шт.

Хромоген, содержит тетраметилбензидин, 7 мл: голубая крышка – 1 шт.

Стоп-реагент, содержит 1 N серную кислоту, 14 мл: желтая крышка – 1 шт.

Буфер, для разбавления препаратов коньюгата и антител, стандартных растворов и растворов образцов 60 мл – 1 шт.

Режим хранения.

Храните набор при температуре 2 - 8°С. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ НАБОР.

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в оригинальный фольгированный пакет вместе с имеющимся осушителем и плотно закройте пакет.

Поскольку раствор хромогена светочувствителен, избегайте попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором.

Признаки порчи реагентов.

В случае окрашивания раствора хромогена не рекомендуется использовать раствор, поскольку окрашивание раствора хромогена является признаком его порчи.

В случае, если величина оптической плотность, измеренной в лунке с нулевым стандартом, не превышает 0.6, это также может быть признаком порчи реагентов.

2. МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

2.1. Отбор проб и подготовка к проведению исследований.

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб.

Пробы доставляют в лабораторию и хранят в холоде в темном месте.

2.1.1. Обезжиренное молоко.

- смешайте пробу обезжиренного молока с приготовленным фосфатным буфером в отношении 1:40, например, смешайте 25 мкл молока с 975 мкл фосфатного буфера;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета.

2.1.2. Жирное молоко.

- центрифугируйте пробу молока для обезжиривания в течение 10-ти минут при 3000 g при15°С (если нет охлаждаемой центрифуги, охладите пробу перед центрифугированием);
- удалите верхний жирный слой;

- смешайте пробу обезжиренного молока с приготовленным фосфатным буфером в отношении 1:40, например, смешайте 25 мкл молока с 975 мкл фосфатного буфера;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета.

2.1.3. Мед.

- взвесьте 1 г меда в пробирку, доведите объем до 10 мл экстрагирующим буфером (см. п. 1.2.3.);
- встряхивайте 10 мин до полного растворения меда;
- отцентрифугируйте раствор до его осветления (около 10 мин при 3000 g при комнатной температуре);

Очистка супернатанта методом твердофазной экстракции.

- с помощью устройства для твердофазной экстракции, руководствуясь инструкцией по его эксплуатации, промойте колонку 2 мл метанола со скоростью 1 капля в секунду. При отсутствии устройства для твердофазной экстракции для создания давления воздуха на входе в колонку используйте разовый пластиковый шприц на 5 мл;
- промойте колонку 2 мл дистиллированной воды со скоростью 1 капля в секунду;
- пропустите через колонку 5 мл подготовленного раствора исследуемой пробы со скоростью 15 капель в минуту;
- промойте колонку 3 мл дистиллированной воды со скоростью 1 капля в секунду;
- удалите из колонки остатки жидкости и просушите колонку в токе воздуха или азота 2 мин;
- адсорбированные на колонке вещества осторожно, со скоростью 15 капель в минуту, элюируют 1 мл метанола в чистую пробирку;
- испарите элюат досуха при 40 - 50°С в слабом токе воздуха или азота;
- растворите сухой остаток в 10 мл фосфатного буфера;

- для анализа используют 50 мкл раствора;

2.1.4. Нежирное мясо.

- гомогенизируйте пробу мяса;
- взвесьте 5 г гомогенизата, смешайте с 20 мл фосфатного буфера и встряхивайте в течение 30мин;
- центрифугируйте раствор при комнатной температуре в течение 10-ти минут при 4000 g;
- разбавьте аликвоту супернатанта фосфатным буфером в отношении 1:10, например, смешайте 50 мкл супернатанта и 450 мкл буфера;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

1.2.5. Жирное мясо.

Обезжиривайте пробы мяса, содержащие заметные количества жира, следующим образом:

- гомогенизируйте пробу мяса;
- взвесьте 5 г гомогенизата, смешайте с 20 мл фосфатного буфера и встряхивайте в течение 30мин;
- центрифугируйте раствор при комнатной температуре в течение 10-ти минут при 4000 g;
- отберите 5 мл супернатанта в чистую пробирку с пробкой, добавьте 3 мл гексана и энергично встряхивайте в течение 5 мин;
- центрифугируйте раствор при комнатной температуре в течение 10-ти минут при 4000 g;
- с помощью пипетки Пастера полностью отберите верхний гексановый слой из пробирки и отбросьте его;
- разбавьте аликвоту обезжиренного водного раствора фосфатным буфером в отношении 1:10, например, смешайте 50 мкл супернатанта и 450 мкл буфера;

- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета.

2.1.6. Печень.

При исследовании сложных проб (например, проб печени) дополнительно очищайте супернатанты методом соосаждения следующим образом:

- гомогенизируйте пробу печени;
- взвесьте 5 г гомогенизата, смешайте с 20 мл фосфатного буфера и встряхивайте в течение 30мин;
- центрифугируйте раствор при комнатной температуре в течение 10-ти минут при 4000 g;
- отберите 4 мл супернатанта в чистую стеклянную пробирку;
- добавьте в пробирку 0,1 мл осадителя 1 и 0,1 мл осадителя 2;
- доведите объем раствора в пробирки до 5 мл, добавив 0,8 мл дистиллированной воды и перемешайте раствор, энергично встряхивая пробирку в течение нескольких секунд;
- центрифугируйте раствор при комнатной температуре в течение 10-ти минут при 4000 g;
- отберите 2 мл супернатанта в чистую пробирку с пробкой, добавьте 3 мл гексана и энергично встряхивайте в течение 5 мин;
- центрифугируйте раствор при комнатной температуре в течение 10-ти минут при 4000 g;
- с помощью пипетки Пастера полностью отберите верхний гексановый слой из пробирки и отбросьте его;
- разбавьте аликвоту обезжиренного водного раствора фосфатным буфером в отношении 1:8, например, смешайте 100 мкл супернатанта и 700 мкл буфера;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

2.2. Порядок проведения измерений.

Предварительные замечания по проведению измерений.

* Перед использованием набора доведите температуру всех реагентов до комнатной.
* Немедленно после использования охладите все оставшиеся реагенты до температуры 2 - 8°С.
* В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания лунок планшета.
* Воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. Внимательно следуйте описанной далее процедуре отмывки планшета.
* На всех стадиях инкубации избегайте воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет крышкой.

2.2.1. Приготовление раствора коньюгата.

Коньюгат стрептомицина с ферментом (флакон с красной крышкой) поставляется в концентрированном виде. Поскольку разбавленный раствор коньюгата имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Перед разбавлением концентрированного раствора коньюгата осторожно встряхните содержимое флакона.

Для приготовления готового к использованию раствора коньюгата разбавьте концентрат коньюгата буферным раствором, имеющимся в составе набора, в отношении 1:11 (например, смешайте 200 мкл концентрата коньюгата с 2 мл буфера - данного разведения достаточно для 4-х стрипов)

2.2.2. Приготовление раствора антител.

Антитела к стрептомицину (флакон с черной крышкой) поставляются в концентрированном виде. Поскольку разбавленный раствор антител имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Перед разбавлением концентрата антител осторожно встряхните содержимое флакона.

Для приготовления готового раствора антител разбавьте концентрат буферным раствором, имеющимся в составе набора, в отношении 1:11 (например, смешайте 200 мкл концентрата антител с 2 мл буфера - данного разведения достаточно для 4-х стрипов).

2.2.3. Микротитровальный планшет, сенсибилизированный антителами к стрептомицину.

Фольгированная упаковка планшета открывается со стороны застежки.

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов вместе с рамкой.

Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8 °С.

2.2.4. Стандартные растворы.

Для приготовления готовых к использованию стандартных растворов стрептомицина концентраты растворов, входящие в состав набора, следует разбавить буфером (в составе набора) в следующей пропорции.

Стандарт 1: 50 мкл концентрата №1+ 450 мкл буферного раствора 0 мкг/кг

Стандарт 2: 50 мкл концентрата №2 + 450 мкл буферного раствора 0,5 мкг/кг

Стандарт 3: 50 мкл концентрата №3+ 450 мкл буферного раствора 2 мкг/кг

Стандарт 4: 50 мкл концентрата №4+ раствора	450 мкл буферного	8 мкг/кг
Стандарт 5: 50 мкл концентрата №5+ раствора	450 мкл буферного	32 мкг/кг
Стандарт 6: 50 мкл концентрата №6+ раствора	450 мкл буферного	128 мкг/кг

После разбавления тщательно перемешайте готовые растворы.

Не используйте пластиковую посуду, для разбавления рекомендуется использовать только стеклянную посуду.

Для каждой серии исследований следует готовить свежие стандартные растворы.

2.2.5. Процедура анализа.

1. Вставьте в рамку-держатель лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Запишите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов. Пример формы записи приведен на Рис. 1.
2. Добавьте по 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок, добавьте по 50 мкл разбавленного раствора коньюгата на донышко каждой лунки.
3. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл готового разбавленного раствора антител. Тщательно перемешайте вручную и оставьте на инкубацию в течение 2-х часов при комнатной температуре.
4. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку-держатель и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполните лунки 250 мкл дистиллированной воды и снова

вылейте воду. Выбейте капельки воды как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок водой еще два раза.

5. Добавьте по 50 мкл субстрата и по 50 мкл хромогена в каждую лунку. Тщательно перемешайте вручную и инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте.
6. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и хорошо перемешайте вручную. В течение 60-ти минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм ("бланк" или нулевое считывание по воздуху).

2.2.6. Обработка результатов измерения.

Средние значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

$$\frac{\text{оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\text{оптическая плотность лунки с нулевым стандартом}} \times 100 = \%\ \text{поглощения}$$

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации стрептомицина в мкг/кг (ppb) строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат. Калибровочная кривая должна быть почти линейна в диапазоне 2 - 32 мкг/кг (см. Рис. 5).

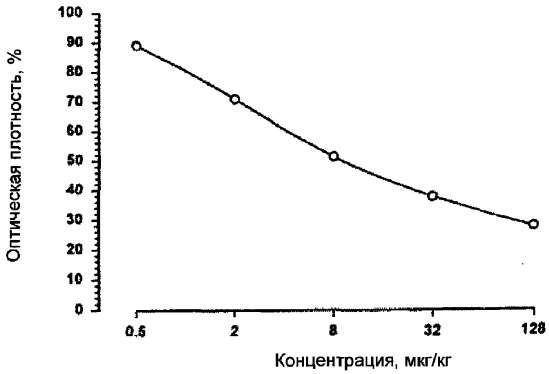

Рисунок 5. Пример калибровочной кривой при определении стрептомицина.

Концентрация стрептомицина в исследуемых растворах в мкг/кг (ppb) считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов.

Внимание:

Для того чтобы вычислить концентрацию стрептомицина в исследуемой исходной пробе, величину концентрации стрептомицина, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

Молоко (стрептомицин)	40
Мед (стрептомицин)	20
Мясо (стрептомицин)	50
Молоко (дигидрострептомицин)	около 27
Мед (дигидрострептомицин)	около 14
Мясо (дигидрострептомицин)	около 34

2.2.7. Чувствительность.

В среднем предел обнаружения стрептомицина составляет 0,5 мкг/кг (мкг/л). С учетом фактора разбавления предел обнаружения составляет 20 мкг/л стрептомицина или 13,5 мкг/л дигидрострептомицина в молоке. Предел обнаружения стрептомицина в мясе составляет около 25 мкг/кг, дигидрострептомицина – 17 мкг/кг, в меде, соответственно 20 и 14 мкг/л.

2.2.8. Специфичность.

Специфичность набора оценивали путем измерения перекрестной чувствительности набора к следующим веществам:

Перекрестная чувствительность:	Стрептомицин	100%
	Дигидрострептомицин	149%

2.2.9. Воспроизводимость.

Воспроизводимость результата измерения внутри серии оценивали по трем параллельным экспериментам. На Рис. 6 дана оценка воспроизводимости результата на одном планшете для разных концентраций стрептомицина. Как видно, значения коэффициента вариации (относительного стандартного отклонения) во всем диапазоне измерения достаточно невелики, что позволяет гарантировать высокую воспроизводимость результата определения.

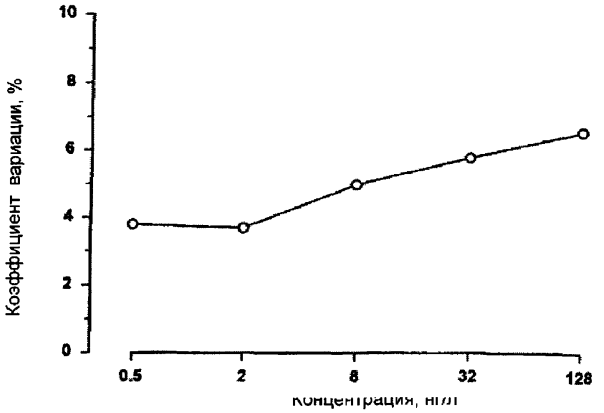

Рисунок 6. Зависимость коэффициента вариации, оцененного для набора RIDASCREEN® Стрептомицин, от измеряемой концентрации стрептомицина.

2.2.10. Степень извлечения.

При искусственном загрязнении проб молока 200 - 1000 мкг/л стрептомицина степень извлечения составила от 75 до 120% (в среднем 97%).

При искусственном загрязнении проб мяса 200 – 500 мкг/кг стрептомицина степень извлечения составила 90% при работе в соответствии с пп. 2.1.4. и 2.1.5.

При искусственном загрязнении проб печени 200 – 500 мкг/кг стрептомицина степень извлечения составила 60% при работе в соответствии с п. 2.1.6.

Г. Количественное определение сульфаметазина в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор диагностических реагентов «RIDASCREEN® Сульфаметазин» предназначен для количественного определения сульфаметазина в молоке, мясе и почках методом конкурентного иммуноферментного анализа.

Набор диагностических реагентов «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» предназначен для количественного определения сульфаметазина в молоке методом конкурентного иммуноферментного анализа

В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами.

1.1.Общие положения.

Поставляемый в комплекте набора планшет сенсибилизирован антителами «захвата», специфичными к антителам к сульфаметазину. Анализ выполняется следующим образом. Исследуемые (стандартные) образцы, раствор, содержащий антитела к сульфаметазину, и раствор, содержащий коньюгат сульфаметазина с ферментом, дозируются в лунки активированного планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы сульфаметазина, содержащиеся в пробе или в стандартном растворе, и молекулы коньюгата сульфаметазина с ферментом, конкурируя между собой, связываются антителами к сульфаметазину. В то же самое время происходит взаимодействие антител «захвата» на подложке планшета с антителами к сульфаметазину.

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются свободные молекулы коньюгата.

После промывки планшета в его лунки дозируется раствор субстрата (пероксид карбамида) и раствор хромогена (тетраметилбензидин). В процессе инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени развития данной цветной реакции, в результате которой бесцветный хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора после добавления стоп-реагента меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на планшетном фотометре при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации сульфаметазина в исследуемых образцах.

1.2. Реактивы и оборудование.

1.2.4. Средства измерения.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Меры массы по ГОСТ 7328.

Спектрофотометр (ридер), снабженный фильтром на 450 нм.

Дозаторы переменного объема на 50, 100, 250, 500 и 1000 мкл.

Цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 мл по ГОСТ 29227.

1.2.2. Вспомогательные устройства.

Центрифуга.

Шейкер типа "вортекс".

Лабораторный встряхиватель.

Гомогенизатор (Stomacher, Ultraturrax).

Микроиспаритель для испарения растворов досуха.

Магнитная мешалка.

Лабораторная посуда (стакан химический вместимостью 250 мл по ГОСТ 25336 или колба коническая со шлифом и притертой пробкой на 250 мл типа КН-1 по ТУ 92-891.029-91, воронки лабораторные типа В-36 или В-75 по ГОСТ 25336, стеклянный бюкс по ГОСТ 25336).

Разовые пипетки (пастерки).

Холодильник бытовой.

1.2.3. Реактивы и материалы.

Дистиллированная вода.

Этилацетат.

н-гексан.

Ацетонитрил.

В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 или 48 определений (включая калибровку по стандартным растворам).

Набор «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» содержит:

Микротитровальный планшет (6 х 8), 48 лунок, сенсибилизированныхантителами «захвата»	1 шт
Концентрированные стандартные растворы сульфаметазина в буфере: 0 мкг/л, 50 мкг/л, 150 мкг/л, 450 мкг/л, 1350 мкг/л, по 1,3 мл	5 шт
Коньюгат сульфаметазина с пероксидазой, 3 мл, (красная крышка)	1 шт
Антитела к сульфаметазину, 3 мл, (черная крышка)	1 шт

Субстрат/хромоген, подкрашен, 6 мл: белая крышка	1 шт
Стоп-реагент, содержит 1 N серную кислоту, 6 мл (желтая крышка)	1 шт
Буфер 1, концентрированный (х 20) моющий и для разбавления стандартных растворов и растворов образцов, 60 мл	1 шт
Буфер 2, 10 мл, для разбавления стандартных растворов (для молока)	1 шт

Набор «RIDASCREEN® Сульфаметазин» содержит:

Микротитровальный планшет (12 х 8), 96 лунок, сенсибилизированныхантителами «захвата»	1 шт
Концентрированные стандартные растворы сульфаметазина в буфере: 0 мкг/л, 10 мкг/л, 30 мкг/л, 90 мкг/л, 270 мкг/л, 810 мкг/л, по 1,3 мл	6 шт
Антитела к сульфаметазину, концентрат (черная крышка)	1 шт
Коньюгат сульфаметазина с пероксидазой, концентрат (красная крышка)	1 шт
Субстрат, содержит пероксид карбамида, 7 мл (зеленая крышка)	1 шт
Хромоген, содержит тетраметилбензидин, 7 мл (голубая крышка)	1 шт
Стоп-реагент, содержит 1 N серную кислоту, 14 мл (желтая крышка)	1 шт
Буфер 1, для разбавления буфера 2, препаратов коньюгата и антител, стандартных растворов и растворов образцов, 60 мл	1 шт
Буфер 2, концентрированный, для разбавления стандартных растворов (для молока)	1 шт

Режим хранения.

Храните наборы при температуре 2 - 8°С. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в оригинальный фольгированный пакет вместе с имеющимся осушителем и плотно закройте пакет.

Поскольку раствор хромогена светочувствителен, избегайте попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором.

Признаки порчи реагентов.

В случае окрашивания раствора хромогена не рекомендуется использовать раствор, поскольку окрашивание раствора хромогена является признаком его порчи.

В случае, если величина оптической плотность, измеренной в лунке с нулевым стандартом, не превышает 0.6, это также может быть признаком порчи реагентов.

2. МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

2.1. Отбор проб и подготовка к проведению исследований.

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб.

Пробы доставляют в лабораторию и хранятся в холоде в темном месте.

2.1.1. Молоко.

Обезжиренное молоко:

- смешайте пробу обезжиренного молока с буфером 1 в отношении 1:9, например, смешайте 50 мкл молока с 450 мкл буфера 1;

ПРИМЕЧАНИЕ: при работе с набором «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» смешайте пробу обезжиренного молока с буфером в отношении 1:1, например, смешайте 500 мкл обезжиренного молока и 500 мкл буфера 1

ВНИМАНИЕ: предварительно разбавьте буфер 1 дистиллированной водой в отношении 1:20!

- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

Жирное молоко:

- центрифугируйте пробу молока для обезжиривания в течение 10-ти минут при 3000 g при10°C (если нет охлаждаемой центрифуги, охладите пробу перед центрифугированием);
- удалите верхний жирный слой;
- смешайте пробу обезжиренного молока с буфером 1 в отношении 1:9, например, смешайте 50 мкл молока с 450 мкл буфера 1;

ПРИМЕЧАНИЕ: при работе с набором «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» смешайте пробу обезжиренного молока с буфером в отношении 1:1, например, смешайте 500 мкл обезжиренного молока и 500 мкл буфера 1

ВНИМАНИЕ: предварительно разбавьте буфер 1 дистиллированной водой в отношении 1:20 .

- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета;

Цельное молоко (только для «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин»):

- центрифугируйте пробу молока для обезжиривания в течение 10-ти минут при 3000 g при10°C (если нет охлаждаемой центрифуги, охладите пробу перед центрифугированием);
- удалите верхний жирный слой;
- смешайте пробу обезжиренного молока с буфером 1 в отношении 1:3, например, смешайте 100 мкл молока с 300 мкл буфера 1;

ВНИМАНИЕ: предварительно разбавьте буфер 1 дистиллированной водой в отношении 1:20 .

- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета

ПРИМЕЧАНИЕ: для того, чтобы повысить чувствительность определения сульфаметазина в цельном молоке, можно вносить на планшет обезжиренное молоко без разбавления его буфером. В этом случае стандарты необходимо готовить на обезжиренном стандартизованном сухом молоке. Чувствительность определения будет составлять 5 мкг/л

2.1.2. Зерно и корма (только для «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин»):

- размелите и перемешайте представительную пробу
- взвесьте 2 г размолотой и перемешанной пробы, поместите навеску в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой
- налейте в пробирку 10 мл 80% раствора метанола, встряхивайте 3 минуты
- оставьте раствор для седиментации осадка (альтернатива: отфильтруйте или отцентрифугируйте)
- предварительно разбавьте буфер 1 дистиллированной водой в отношении 1:20 (см. п. 10.2)
- разбавьте супернатант готовым буфером 1 в отношении 1:20, например, смешайте 50 мкл супернатанта с 950 мкл буфера 1
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета

2.1.3. Мясо и почки (только для «RIDASCREEN® Сульфаметазин»):

Количественный метод.

- отделите жир от исследуемых образцов и гомогенизируйте пробу;
- взвесьте 5 г гомогенизата, смешайте с 20 мл 84 % раствора ацетонитрила в воде и встряхивайте в течение 10мин;
- центрифугируйте раствор при 15° С в течение 10-ти минут при 3000 g;

- разбавьте 3 мл супернатанта с 3 мл дистиллированной воды;
- добавьте к раствору 4,5 мл этилацетата и встряхивайте в течение 10 мин;
- центрифугируйте раствор при 15° С в течение 10-ти минут при 3000 g;
- этилацетатный слой перенесите в другую пробирку и испарите экстракт досуха;
- растворите сухой остаток в 1,5 мл разбавленного буфера 1;

ВНИМАНИЕ: предварительно разбавьте буфер 1 дистиллированной водой в отношении 1:20 .

- для обезжиривания раствора добавьте в пробирку 1,5 мл гексана и встряхивайте раствор в течение 5 мин;
- центрифугируйте раствор при 15° С в течение 10-ти минут при 3000 g;
- с помощью пипетки Пастера полностью удалите гексановый слой;
- для анализа используйте 50 мкл водной фазы на лунку планшета;

Полуколичественный метод.

- для анализа используется либо свежее, либо замороженное мясо;
- при исследовании замороженного мяса доведите образец до комнатной температуры, промойте его дистиллированной водой и обсушите фильтровальной бумагой;
- отделите жир от исследуемых образцов;
- навеску 1 г образца поместите в пробирку, добавьте 10 мл буфера 1;

ВНИМАНИЕ: предварительно разбавьте буфер 1 дистиллированной водой в отношении 1:20 .

- гомогенизируйте содержимое пробирки при 13 500 об/мин в течение 30 сек ;
- центрифугируйте гомогенат при комнатной температуре в течение 10-ти минут при 4000 g;

- осторожно отберите супернатант с помощью пипетки (избегайте попадания жира в пипетку!);
- для анализа используйте 50 мкл супернатанта на лунку планшета;

Примечание: выполняйте анализ в день пробоподготовки!

При необходимости допускается хранение растворов, готовых для анализа, до 3-х месяцев при минус 20° С. Перед анализом доводите температуру растворов до комнатной!

2.2. Порядок проведения измерений.

Предварительные замечания по проведению измерений

- ✓ Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной.
- ✓ Немедленно после использования охлаждают все оставшиеся реагенты до температуры 2 - 8°С.
- ✓ В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета.
- ✓ Воспроизводимость результатов анализа существенно зависит от тщательности отмывки колонки в процессе пробоподготовки. Внимательно следуют описанной процедуре отмывки колонки.
- ✓ На всех стадиях инкубации избегайте воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет непрозрачным экраном.

2.2.1. Приготовление буфера 1.

Буфер 1 предоставляется как концентрат (20х).

Перед выполнением исследования разбавьте буфер 1 дистиллированной водой в отношении 1: 20, например, смешайте 50 мл буфера и 1 л дистиллированной воды. Рекомендуется разбавлять буфер в 1 шаг.

Срок хранения разбавленного буфера нанесен на этикетку флакона с концентрированным буфером при условии хранения при 4° С

2.2.2. Приготовление буфера 2 (только для образцов молока при использовании «RIDASCREEN® Сульфаметазин»).

Для приготовления готового буферного раствора №2, использующегося при исследовании проб молока, разбавьте концентрат буфера №2 (флакон с белой крышкой) 9 мл разбавленного буферного раствора №1 и тщательно перемешайте (например, при помощи шейкера типа "Вортекс"). Мутность раствора не влияет на результат определения, однако осадок на дне флакона после перемешивания должен быть распределен в объеме раствора.

2.2.3. Приготовление раствора коньюгата (только при использовании «RIDASCREEN® Сульфаметазин»)

Коньюгат сульфаметазина с ферментом (флакон с красной крышкой) поставляется в концентрированном виде. Поскольку разбавленный раствор коньюгата имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Перед разбавлением концентрированного раствора коньюгата осторожно встряхните содержимое флакона.

Для приготовления готового к использованию раствора коньюгата разбавьте концентрат коньюгата готовым буферным раствором №1 в отношении 1:11 (например, смешайте 200 мкл концентрата коньюгата с 2 мл готового буфера №1 - данного разведения достаточно для 4-х стрипов)

2.2.4. Приготовление раствора антител (только при использовании «RIDASCREEN® Сульфаметазин»)

Антитела к сульфаметазину (флакон с черной крышкой) поставляются в концентрированном виде. Поскольку разбавленный раствор антител имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Перед разбавлением концентрата антител осторожно встряхните содержимое флакона.

Для приготовления готового раствора антител разбавьте концентрат готовым буферным раствором №1 в отношении 1:11 (например, смешайте 200 мкл концентрата антител с 2 мл готового буфера №1 - данного разведения достаточно для 4-х стрипов).

2.2.5. Микротитровальный планшет, сенсибилизированный «антителами захвата».

Фольгированная упаковка планшета открывается со стороны застежки.

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов вместе с рамкой.

Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8 °С.

2.2.6. Стандартные растворы.

Для приготовления готовых к использованию стандартных растворов сульфаметазина концентраты растворов, входящие в состав набора, следует разбавить готовым буфером №1 в следующей пропорции:

при использовании «RIDASCREEN® Сульфаметазин»

Стандарт 1: 50 мкл концентрата №1+ 450 мкл буферного раствора 0 мкг/кг
Стандарт 2: 50 мкл концентрата №2 +450 мкл буферного раствора 1 мкг/кг
Стандарт 3: 50 мкл концентрата №3+ 450 мкл буферного раствора 3 мкг/кг
Стандарт 4: 50 мкл концентрата №4+ 450 мкл буферного раствора 9 мкг/кг
Стандарт 5: 50 мкл концентрата №5+ 450 мкл буферного раствора 27 мкг/кг
Стандарт 6: 50 мкл концентрата №6+ 450 мкл буферного раствора 81 мкг/кг

при использовании «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин»

Стандарт 1: 50 мкл концентрата №1+ 450 мкл буферного раствора 0 мкг/л
Стандарт 2: 50 мкл концентрата №2 +450 мкл буферного раствора 5 мкг/л
Стандарт 3: 50 мкл концентрата №3+ 450 мкл буферного раствора 15 мкг/л
Стандарт 4: 50 мкл концентрата №4+ 450 мкл буферного раствора 45 мкг/л
Стандарт 5: 50 мкл концентрата №5+ 450 мкл буферного раствора 135 мкг/л

После разбавления тщательно перемешайте готовые растворы.

Не используйте пластиковую посуду, для разбавления рекомендуется использовать только стеклянную посуду.

ВНИМАНИЕ: При исследовании образцов молока для разведения используйте готовый буферный раствор №2, при исследовании зерна и кормов с помощью «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» используйте буфер 1 с 4% метанола

Для качественного анализа при помощи используйте только два стандартных раствора как положительный и отрицательный контроль

Ниже дан пример использования набора «RIDASCREEN® Сульфаметазин» для качественного анализа

Стандарт 1: 50 мкл концентрата №1+450 мкл буферного раствора 0 мкг/кг

Стандарт 4: 50 мкл концентрата №4+450 мкл буферного раствора 9 мкг/кг

ВНИМАНИЕ: Для каждой серии исследований следует готовить свежие стандартные растворы.

2.2.7. Процедура анализа.

1. Вставьте в рамку-держатель лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Запишите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов.
2. Добавьте по 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок.
3. Добавьте по 50 мкл разбавленного раствора коньюгата на донышко каждой лунки.
4. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл разбавленного раствора антител. Осторожно перемешайте вручную и оставьте на инкубацию в течение 2-х часов при комнатной температуре (для RIDASCREEN® «FAST Сульфаметазин» время инкубации составляет 10 мин).

5. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку-держатель и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполните лунки 250 мкл дистиллированной воды (при использовании «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» лунки следует промывать буфером № 1) и снова вылейте воду. Выбейте капельки воды как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок водой еще два раза.
6. Добавьте по 50 мкл субстрата и по 50 мкл хромогена (100 мкл субюстрата/хромогена для «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин») в каждую лунку. Осторожно перемешайте вручную и инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 минут (для «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» – 5 минут) в темноте.
7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и осторожно перемешайте вручную. В течение 60-ти минут (для «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» – в течение 10 минут) после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм ("бланк" или нулевое считывание по воздуху).

Примечание: при полуколичественном анализе достаточно одной лунки на каждую пробу и стандартный раствор.

2.2.8. Обработка результатов измерения.

2.2.8.1. Количественный метод.

Средние значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым)

стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

$$\frac{\text{оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\text{оптическая плотность лунки с нулевым стандартом}} \times 100 = \%\ \text{поглощения}$$

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим значениям концентрации сульфаметазина в мкг/кг (ppb) строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат (см. Рис. 7).

Концентрация сульфаметазина в исследуемых растворах в мкг/кг (ppb) считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов.

Внимание:

Для того, чтобы вычислить концентрацию сульфаметазина в исследуемой исходной пробе, величину концентрации сульфаметазина, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

«RIDASCREEN® Сульфаметазин»

молоко -10, мясо и почки – 2

«RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин»

молоко -2, цельное молоко – 2, зерно и корма - 100

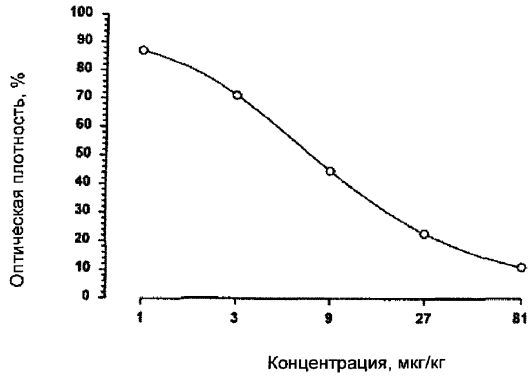

Рисунок 7. Пример калибровочной кривой при определении сульфаметазина

Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение, например, RIDA® SOFT. При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения и рекомендациями разработчика.

2.2.8.2. Полуколичественный метод (для «RIDASCREEN Сульфаметазин»)

Порог интерпретации результатов, как положительных или отрицательных устанавливаетс, как произведение оптической плотности лунки №4 на коэффициент 1,2.

Коэффициент 1,2 отражает потери сульфаметазина при упрощенной пробоподготовке.

Интерпретация результата как отрицательный (концентрация сульфаметазина меньше 100 мкг/кг):

Результат интерпретируют как отрицательный, если оптическая плотность, измеренная в лунке с пробой, больше, чем порог интерпретации.

Интерпретация результата как положительный (концентрация сульфаметазина больше или равна 100 мкг/кг):

Результат интерпретируют как положительный, если оптическая плотность, измеренная в лунке с пробой, меньше, чем порог интерпретации.

2.2.9. Чувствительность.

Предел обнаружения сульфаметазина с помощью набора «RIDASCREEN® Сульфаметазин» составляет 1 мкг/кг (мкг/л). С учетом фактора разбавления предел обнаружения составляет 10 мкг/л сульфаметазина в молоке, 2 мкг/кг в мясе и почках.

Предел обнаружения сульфаметазина с помощью набора «RIDASCREEN® FAST Сульфаметазин» составляет 5 мкг/л (мкг/кг). С учетом фактора разбавления предел обнаружения составляет 10 мкг/кг сульфаметазина в молоке, 20 мкг/л в цельном молоке, 500 мкг/кг в зерне и кормах

2.2.10. Специфичность.

Специфичность наборов оценивали путем измерения перекрестной чувствительности к следующим сульфаниламидам:

Перекрестная чувствительность:	Сульфаметазин	100 %
	Сульфамеразин	56,1%
	Сульфамоксол	2,2 %
	Сульфадиазин	0,9 %

2.2.11. Воспроизводимость.

Воспроизводимость результата измерения внутри серии оценивали по трем параллельным экспериментам. На Рис. 2 дана оценка воспроизводимости результата на одном планшете для разных концентраций сульфаметазина. Как видно, значения коэффициента вариации (относительного стандартного отклонения) во всем диапазоне измерения достаточно невелики, что позволяет гарантировать высокую воспроизводимость результата определения.

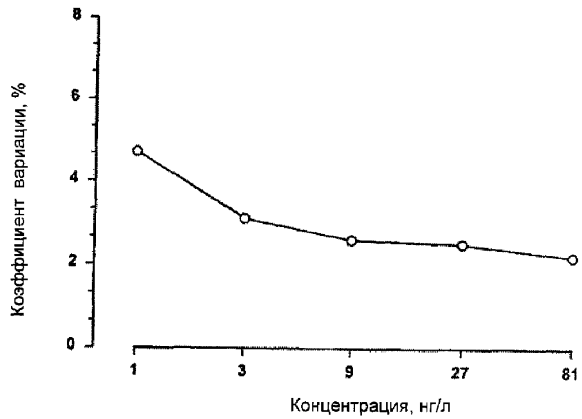

Рисунок 8. Зависимость коэффициента вариации, оцененного для набора «RIDASCREEN® Сульфаметазин», от измеряемой концентрации сульфаметазина

2.2.12. Степень извлечения.

При искусственном загрязнении проб молока 100 мкг/л сульфаметазина степень извлечения составила 99% (при коэффициенте вариации 4,7%).

При искусственном загрязнении проб мяса 50 мкг/кг сульфаметазина степень извлечения составила 95% (при коэффициенте вариации 4,9%).

При полуколичественном определении сульфаметазина в мясе степень извлечения – 50% .

Д. Количественное определение нитрофуранов в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

После применения фуразолидона образуется метаболит 3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ), фуралтадона - метаболит 3-амино-5-морфолинометил-2-оксизолидинон (АМОЗ), нитрофурантоина - метаболит 1-аминохидантоин (АХД) и нитрофуразона - семикарбазид (СЕМ).

Набор «RIDASCREEN® Нитрофуран» предназначен для количественного определения АОЗ и АМОЗ-остатков в мясе птицы, свинине, говядине и креветках, а также в молоке (для АОЗ) методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами.

1.1. Общие положения.

Поставляенмый в комплекте набора планшет сенсибилизирован антителами «захвата», специфичными к АОЗ и АМОЗ-антителам. Анализ выполняется следующим образом. Исследуемые (стандартные) образцы, реактив, содержащий АОЗ (АМОЗ)-антитела и реактив, содержащий коньюгат с ферментом, дозируются в лунки активированного планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы АОЗ (АМОЗ) и молекулы коньюгата с ферментом, конкурирую между собой, связываются АОЗ (АМОЗ)-антителами. В то же самое время при инкубации происходит иммуносорбция этих антител на поверхность лунок планшета за счет их взаимодействия с антителами «захвата» на поверхности.

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются свободные молекулы коньюгата.

После промывки планшета в его лунки дозируется раствор, содержащий субстрат и хромоген. В процессе инкубации, при химическом

взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени развития данной цветной реакции, в результате которой бесцветный хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент для прекращения реакции, при этом голубой цвет раствора меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на планшетном фотометре при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации АОЗ (АМОЗ) в исследуемых образцах.

1.2. Реактивы и оборудование.

1.2.1. Средства измерения.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Меры массы по ГОСТ 7328.

Спектрофотометр (ридер), снабженный фильтром на 450 нм.

Дозаторы переменного объема на 50, 100, 250, 500 и 1000 мкл.

Цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 мл по ГОСТ 29227.

1.2.2. Вспомогательные устройства.

Центрифуга.

Шейкер типа "вортекс".

Лабораторный встряхиватель.

Гомогенизатор (Stomacher, Ultraturrax).

Микроиспаритель для испарения растворов досуха.

Магнитная мешалка.

Лабораторная посуда (стакан химический вместимостью 250 мл по ГОСТ 25336 или колба коническая со шлифом и притертой пробкой на 250 мл типа КН-1 по ТУ 92-891.029-91, воронки лабораторные типа В-36 или В-75 по ГОСТ 25336, стеклянный бюкс по ГОСТ 25336).

Разовые пипетки (пастерки).

Холодильник бытовой.

1.2.3. Реактивы и материалы.

Дистиллированная вода.

1 М соляная кислота.

1 М гидроксид натрия.

2-нитробензальдегид (10 мМ в диметилсульфоксиде), готовят перед использованием, растворяя 7,6 мг 2-нитробензальдегида в 5 мл ДМСО.

0,1 М K_2HPO_4.

Этилацетат.

н-гексан (или н-гептан).

Осадитель 1 (Каррез 1) - 0.36 М раствор ферроцианида (II) калия х 3 H_2O (1,52 г растворить в 10 мл дистиллированной воды).

Осадитель 2 (Каррез 2) - 1.04 М раствор сульфата цинка х 7 H_2O (2,99 г растворить в 10 мл дистиллированной воды).

В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 определений (включая калибровку по стандартным растворам).

Набор содержит

Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), сенсибилизированных антителами «захвата» -1 шт.

Комплект стандартных растворов АОЗ со следующими концентрациями: 0 нг/л, 50 нг/л, 150 нг/л, 450 нг/л, 1350 нг/л, 4050 нг/л, в водном растворе, по 1,3 мл – 6 х 1 шт.

(В тест-наборах для определения АМОЗ содержится соответственно

Комплект стандартных растворов АМОЗ со следующими концентрациями: 0 нг/л, 100 нг/л, 300 нг/л, 900 нг/л, 2700 нг/л, 8100 нг/л, в водном растворе, по 1,3 мл – 6 х 1 шт.)

Коньюгат АОЗ с пероксидазой, 6 мл: красная крышка – 1 шт.

(Коньюгат АМОЗ с пероксидазой, 6 мл: красная крышка – 1 шт.)

АОЗ-Антитела , 6 мл: черная крышка – 1 шт.

(АМОЗ-Антитела , 6 мл: черная крышка – 1 шт.)

Субстрат-хромоген, окрашенный в красный цвет, содержит тетраметилбензидин 10 мл: синяя крышка – 1 шт.

Стоп-реагент, содержит 1 N серную кислоту, 14 мл: желтая крышка – 1 шт.

Образец –соль моющего буфера для приготовления фосфатного буфера 10 мМ, pH 7,4, содержащего 0,05% твин 20 – 1 шт.

Режим хранения.

Храните набор при температуре 2 - 8°С. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ НАБОР.

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в оригинальный фольгированный пакет вместе с имеющимся осушителем и плотно закройте пакет.

Поскольку раствор хромогена светочувствителен, избегайте попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором.

Признаки порчи реагентов.

В случае окрашивания раствора хромогена не рекомендуется использовать раствор, поскольку окрашивание раствора хромогена является признаком его порчи.

В случае, если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, не превышает 0.6, это также может быть признаком порчи реагентов.

2. МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

2.1. Отбор проб и подготовка к проведению исследований.

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб.

Пробы доставляют в лабораторию и хранят в холоде в темном месте.

2.1.1. Молоко (для АОЗ).

- перенесите пробу молока (например, 5 мл) в стеклянную центрифужную пробирку;
- добавьте 250 мкл раствора Карреза 1 и 250 мкл Карреза 2 и тщательно перемешайте ;
- центрифугируйте при 4 - 12°С в течение 10-ти минут при 3000 g (если у Вас нет центрифуги с охлаждением, охладите пробы до 8°С перед центрифугированием);
- далее см. п. 2.1.2.

2.1.2. Креветки и мясо.

- гомогенизируйте представительную пробу (например, 100 г) в гомогенизаторе, блендере или миксере;
- взвесьте в стеклянной центрифужной пробирке 1 г гомогената (1,1 мл супернатанта для молока), смешайте с 4 мл дистиллированной воды, 0,5

мл 1М соляной кислоты и добавьте 100 мкл 10 мМ 2-нитробензальдегида (в ДМСО);

- инкубируйте полученную смесь в течение 16 часов при 37°С;
- добавьте 5 мл 0,1 М K_2HPO_4, 0,4 мл 1 М NaOH и 5 мл этилацетата и 30 сек тщательно перемешайте;
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g;
- 2,5 мл этилацетатной фазы перенесите в чистый сосуд для выпаривания;
- растворите сухой остаток 1 мл n–гексана (или гептана) и тщательно перемешайте на вортексе с 1 мл Буфера для проб;
- центрифугируйте при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 10-ти минут при 3000 g;
- для анализа используйте 50 мкл раствора (водная фаза) на лунку планшета;

2.2. Порядок проведения измерений.

Предварительные замечания по проведению измерений

- ✓ Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной.
- ✓ Немедленно после использования охлаждают все оставшиеся реагенты до температуры 2 - 8°С.
- ✓ В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета.
- ✓ Воспроизводимость результатов анализа существенно зависит от тщательности отмывки колонки в процессе пробоподготовки. Внимательно следуют описанной процедуре отмывки колонки.
- ✓ На всех стадиях инкубации избегайте воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет непрозрачным экраном.

2.2.1. Приготовление буфера.

В тест-наборе имеется 1 упаковка с буферной солью для приготовления моющего буфера (буфера для проб). Для этого содержимое упаковки высыпают в мерную колбу на 1 л , растворяют в дистиллированной воде и доводят содержимое колбы до метки. Раствор хранят при 2-8°С в течение 4 недель.

2.2.4. Микротитровальный планшет, сенсибилизированный антителами.

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов.

Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8 °С.

2.2.5. Процедура анализа.

1. Вставьте в рамку планшета лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Запишите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов. Пример формы записи приведен на Рис. 1.

2. Добавьте по 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок

3. Добавьте по 50 мкл раствора коньюгата на донышко каждой лунки.

4. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл готового раствора антител. Перемешайте вручную, соблюдая осторожность, и оставьте на инкубацию в течение 1часа при комнатной температуре (20 – 25°С).

5. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку планшета и выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому

фильтровальной бумагой. Наполните лунки 250 мкл промывочным буфером и снова вылейте. Выбейте капельки, как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок буфером еще два раза.

6. Добавьте в пустые лунки по 100 мкл субстрата и по 100 мкл хромогена в каждую лунку. Перемешайте вручную, соблюдая осторожность, и инкубируйте при комнатной температуре (20 – 25°С) в течение 15 минут в темноте.

7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и хорошо перемешайте вручную. В течение 60-ти минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм ("бланк" или нулевое считывание по воздуху).

2.2.6. Обработка результатов измерения.

Средние значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

$$\frac{\text{Оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\text{Оптическая плотность лунки с нулевым стандартом}} \text{ поглощения} \times 100 = \%$$

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации АОЗ в нг/кг, строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат. Калибровочная кривая должна быть почти линейна в диапазоне 150 - 1350 нг/кг для АОЗ и 300 – 2700 нг/кг для АМОЗ.

Концентрация АОЗ и АМОЗ в исследуемых растворах в нг/кг (или нг/л, ppt) считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов.

Для того, чтобы вычислить концентрацию в исследуемой исходной пробе, величину концентрации АОЗ или АМОЗ, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на фактор разбавления – 2.

Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение, например, RIDA® SOFT. При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения и рекомендациями разработчика.

2.2.7. Чувствительность.

Предел обнаружения АОЗ-остатков в экстрактах с помощью набора «RIDASCREEN®» составляет около 100 нг/кг (ppt), для АМОЗ-остатков – 200 нг/кг.

2.2.8. Специфичность.

Специфичность набора реагентов «RIDASCREEN Нитрофуран (АОЗ)» оценивали путем измерения перекрестной чувствительности набора к следующим метаболитам нитрофуранов:

Перекрестная чувствительность:

АМОЗ	< 0,01%
АХД	< 0,01%
СЕМ	< 0,01%

Специфичность набора реагентов «RIDASCREEN Нитрофуран (AMOЗ)» оценивали путем измерения перекрестной чувствительности набора к следующим метаболитам нитрофуранов:

Перекрестная чувствительность:

АОЗ	< 0,05%
АХД	< 0,05%
СЕМ	< 0,05%

2.2.9. Воспроизводимость.

Воспроизводимость результатов измерения внутри серии оценивали по трем параллельным экспериментам. Была дана оценка воспроизводимости результатов на одном планшете для разных концентраций АОЗ и АМОЗ. Значения коэффициентов вариаций (относительного стандартного отклонения) во всем диапазоне измерения оказались достаточно небольшими, что позволяет гарантировать высокую воспроизводимость результатов определения.

2.2.10. Степень извлечения.

Степень извлечения метаболита АОЗ при искусственном контаминировании креветок достигала 90-100%. Для мяса (курятина, свинина, говядина) и молока этот показатель составил 80-90%.

Степень извлечения метаболита АМОЗ достигала соответственно 90-100% и 70-80%.

Е. Количественное определение фторхинолонов в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор «RIDASCREEN® Enro/Cipro» предназначен для количественного определения энрофлоксацина и ципрофлоксацина в молоке, мясе (свинине, птице, утке), рыбе методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA/ИФА).

В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами.

1.1.Общие положения.

Поставляемый в комплекте набора планшет сенсибилизирован «антителами захвата», специфичными к антителам ципрофлоксацина. Анализ выполняется следующим образом. Исследуемые (стандартные) образцы, раствор, содержащий антитела к ципрофлоксацину и раствор, содержащий коньюгат ципрофлоксацина с ферментом, дозируются в лунки активированного планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы, ципрофлоксацина содержащиеся в пробе или в стандартном растворе и молекулы коньюгата кипрофлоксацина с ферментом, конкурируя между собой, связываются антителами к ципрофлоксацину. В то же самое время происходит взаимодействие «антител захвата» на подложке планшета с антителами к ципрофлоксацину.

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются свободные молекулы коньюгата.

После промывки планшета в его лунки дозируется раствор субстрата (пероксид карбамида) и раствор хромогена (тетраметилбензидин). В процессе инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени

развития данной цветной реакции, в результате которой бесцветный хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора после добавления стоп-реагента меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на планшетном фотометре при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации ципрофлоксацина в исследуемых образцах.

1.2. Реактивы и оборудование.

1.2.1. Средства измерения.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Меры массы по ГОСТ 7328.

Спектрофотометр (ридер), снабженный фильтром на 450 нм.

Дозаторы переменного объема на 50, 100, 250, 500 и 1000 мкл.

Цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 мл по ГОСТ 29227.

1.2.2. Вспомогательные устройства.

Центрифуга.

Шейкер типа "вортекс".

Лабораторный встряхиватель.

Гомогенизатор (Stomacher, Ultraturrax).

Лабораторная посуда (стакан химический вместимостью 250 мл по ГОСТ 25336 или колба коническая со шлифом и притертой пробкой на 250 мл типа КН-1 по ТУ 92-891.029-91, воронки лабораторные типа В-36 или В-75 по ГОСТ 25336, стеклянный бюкс по ГОСТ 25336).

Разовые пипетки (пастерки).

Холодильник бытовой.

1.2.3. Реактивы и материалы.

Дистиллированная вода.

Метанол

В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 определений (включая калибровку по стандартным растворам).

Набор содержит:

Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), сенсибилизированных антителами «захвата» -1 шт.

Комплект стандартных растворов ципрофлоксацина со следующими концентрациями: 0 мкг/кг, 1 мкг/кг, 3 мкг/кг, 9 мкг/кг, 27 мкг/кг, 81 мкг/л в растворе метанола готовые к использованию, по 1,3 мл – 6х1 шт.

Коньюгат ципрофлоксацина с пероксидазой, готовый к использованию, 6 мл: красная крышка – 1 шт.

Антитела к ципрофлоксацину, готовые к использованию, 6 мл: черная крышка – 1 шт.

Субстрат/Хромоген, содержит тетраметилбензидин, 10 мл: голубая крышка – 1 шт.

Стоп-реагент, содержит 1 N серную кислоту, 14 мл: желтая крышка – 1 шт.

Моющий буфер (соль) для приготовления 10мМ фосфатного буфера, pH 7,4 содержащий 0,05% твина 20

Режим хранения.

Храните набор при температуре 2 - 8°С. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ НАБОР.

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в оригинальный фольгированный пакет вместе с имеющимся осушителем и плотно закройте пакет.

Поскольку раствор хромогена светочувствителен, избегайте попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором.

Признаки порчи реагентов.

В случае окрашивания раствора хромогена не рекомендуется использовать раствор, поскольку окрашивание раствора хромогена является признаком его порчи.

В случае, если величина оптической плотность, измеренной в лунке с нулевым стандартом, не превышает 0.6, это также может быть признаком порчи реагентов.

2. МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

2.1. Отбор проб и подготовка к проведению исследований.

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб.

Пробы доставляют в лабораторию и хранят в холоде в темном месте.

2.1.1. Молоко.

- для анализа используйте 50 мкл молока на лунку планшета.

2.1.2. Мясо (говядина, свинина, баранина, курица, утка), креветки и рыба.

- гомогенизируйте пробу;
- взвесьте 1 г гомогенизата, смешайте с 4 мл 70% раствора метанола;
- встряхивайте 10 мин путем переворачивания пробирки вверх-вниз или на вотексе;
- центрифугируйте раствор 10 мин при 3000 g при комнатной температуре;
- отберите супернатант и добавьте дистиллированную воду в соотношении один к одному;
- для анализа используйте 50 мкл раствора на лунку планшета.

2.2. Порядок проведения измерений.

Предварительные замечания по проведению измерений.

* Перед использованием набора доведите температуру всех реагентов до комнатной.
* Немедленно после использования охладите все оставшиеся реагенты до температуры 2 - 8°С.
* В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания лунок планшета.
* Воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. Внимательно следуйте описанной далее процедуре отмывки планшета.
* На всех стадиях инкубации избегайте воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет крышкой.
* Приготовленный моющий буфер хранится при 4С в течение 4 недель

2.2.1. Микротитровальный планшет.

Фольгированная упаковка планшета открывается со стороны застежки.

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов вместе с рамкой.

Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8 °С.

Не допускайте высыхания лунок планшета во время работы.

2.2.2. Процедура анализа.

1. Вставьте в рамку-держатель лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Запишите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов.

2. Добавьте по 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок, используя чистые наконечники для каждого раствора.

3. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл раствора конъюгата.

4. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл раствора антител тщательно перемешайте вручную и оставьте на инкубацию в течение 1-го часа при комнатной температуре.

5. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку-держатель и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполните лунки 250 мкл готового моющего буфера и снова вылейте воду. Выбейте капельки воды как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок водой еще два раза.

6. Добавьте по 100 мкл субстрат/хромоген в каждую лунку. Тщательно перемешайте вручную и инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте.

7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и хорошо перемешайте вручную. В течение 30-ти минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм ("бланк" или нулевое считывание по воздуху).

2.2.3. Обработка результатов измерения.

Средние значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

$$\frac{\text{оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\text{оптическая плотность лунки с нулевым стандартом}} \times 100 = \%\ \text{поглощения}$$

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации ципрофлоксацина в мкг/кг (ppb) строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат.

Концентрация ципрофлоксацина в исследуемых растворах в мкг/кг (ppb) считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов.

Внимание:

Для того чтобы вычислить концентрацию ципрофлоксацина в исследуемой исходной пробе, величину концентрации ципрофлоксацина, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

Молоко.....1

Говядина, свинина, баранина, курица, утка… 10

Рыба, креветки 10

2.2.4. Чувствительность.

Предел обнаружения ципрофлоксацина с помощью набора «RIDASCREEN® Enro/Cipro» с учетом фактора разбавления предел обнаружения составляет 1 мкг/кг ципрофлоксацина в молоке. Предел обнаружения ципрофлоксацина в мясе, рыбе и креветках составляет 10 мкг/кг.

2.2.5. Специфичность.

Специфичность набора реагентов «RIDASCREEN® Enro/Cipro» оценивали путем измерения перекрестной чувствительности набора к следующим веществам:

Перекрестная чувствительность:	Энрофлоксацин	Около 100%
	Ципрофлоксацин	100%

Данофлоксацин	80-85%
Норфлоксацин	12-15%
Флюмекин	Около 7%
Марбофлоксацин	Около 5%
Оксолиновая кислота	Около 5%

gost.e-ecolog.ru