

Общество с ограниченной ответственностью
Научно-производственное объединение «Иммунотэкс»

**Методика измерений массовой концентрации антибиотиков
тетрациклиновой группы в продукции животного происхождения методом
иммуноферментного анализа с использованием
тест - систем производства «Иммунотэкс»**

Аттестована
Федеральным бюджетным учреждением «Государственный региональный центр
стандартизации, метрологии и испытаний в Ростовской области»
(ФБУ «Ростовский ЦСМ»)

Ставрополь
2023

СВЕДЕНИЯ О РАЗРАБОТКЕ

РАЗРАБОТАНА: Общество с ограниченной ответственностью
Научно-производственное объединение «Иммунотэкс»
(ООО НПО «Иммунотэкс»)

ИСПОЛНИТЕЛЬ: Научный отдел ООО НПО «Иммунотэкс»

Адрес: 355021, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Доваторцев, 177 Г, стр.1
Телефоны: +7(8652)28-34-60
Факс: +7(8652)28-34-60
e-mail:market@immunotex.ru

Фамилия, имя, отчество, должность руководителя организации:
Директор ООО НПО «Иммунотэкс» Батурин Михаил Владимирович

СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

АТТЕСТОВАНА: Федеральным бюджетным учреждением «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Ростовской области» (ФБУ «Ростовский ЦСМ»)

Уникальный номер записи в реестре аккредитованных лиц на право аттестации методик (методов) измерений и проведения метрологической экспертизы документов № 01.00281-2013

Свидетельство об аттестации методики измерений
№ 003-01.00281-2013-2020 от 01.02.2023 г.

Адрес:344000, г. Ростов-на-Дону, пр. Соколова, 58/173
Телефон: (863)264-19-74
Факс: (863)291-08-02
e-mail: info@rostcsm.ru

Фамилия, имя, отчество, должность руководителя организации:
Генеральный директор ФБУ «Ростовский ЦСМ» Красавин Александр Васильевич

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ

Регистрационный код методики измерений по Федеральному реестру

Содержание

1 Область применения	4
2 Нормативные ссылки	4
3 Приписанные характеристики погрешности измерений и ее составляющих	5
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, растворы и материалы	6
4.1 Средства измерений	6
4.2 Вспомогательное оборудование, лабораторная посуда и материалы	6
4.3 Реактивы и растворы	7
4.4 Стандартные образцы	7
4.5 Тест-система для иммуноферментного анализа	8
5 Сущность метода	8
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды	9
7 Требования к квалификации оператора	9
8 Условия выполнения измерений	9
9 Отбор проб	10
10 Подготовка к выполнению измерений	10
10.1 Подготовка оборудования и стеклянной посуды	10
10.2 Подготовка и хранение Тест-системы	10
10.3 Приготовление растворов и реактивов	10
10.4 Приготовление градуировочных растворов тетрациклина	11
10.5 Подготовка образцов для испытаний (измерений)	12
11 Выполнение измерений	16
12 Обработка (вычисление) и оформление результатов измерений	17
12.1 Вычисление результатов измерений	17
12.2 Оформление результатов измерений	18
13 Контроль качества результатов измерений	19
14 Проверка приемлемости результатов, полученных в условиях воспроизводимости	21

1 Область применения

1.1 Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой концентрации антибиотиков тетрациклиновой группы в продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа с использованием тест - систем производства «Иммунотэк».

1.2 Настоящий документ регламентирует порядок определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием «Набора для определения тетрациклина методом ИФА» в продуктах животного происхождения, в том числе в молоке (сухое, цельное), молочных продуктах (творог, сливки, йогурт, кефир, сметана, сыр, масло сливочное), в тканях (рыба, креветки, печень, мясо скота и птицы), яйцах, мёде.

1.3 Настоящая методика измерений предназначена для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и других организаций и ведомств, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Методика измерений методом иммуноферментного анализа обеспечивает высокую чувствительность, специфичность, точность и используется с различным целевым назначением (арбитраж, скрининг и др.).

Предел обнаружения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции методом иммуноферментного анализа составляет 0,0003 мг/кг (мг/дм³).

1.4 Содержание антибиотиков тетрациклиновой группы в продуктах животного происхождения регламентируется СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 024/2011 Технический регламент Таможенного союза «Технический регламент на масложировую продукцию», ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции», ТР ТС 034/2013 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции».

В продуктах животного происхождения регламентируемое содержание антибиотиков тетрациклиновой группы не должно превышать 0,01 мг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем руководящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

1 ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции».

2 ТР ТС 024/2011 Технический регламент Таможенного союза «Технический регламент на масложировую продукцию».

3 ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции».

4 ТР ТС 034/2013 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции».

5 СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

6 СанПин 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами".

7 ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования (с Изменением № 1).

8 ГОСТ 12.4.009-83 ССБТ. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание.

9 ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

10 ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

11 ГОСТ Р 12.1.019-09 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

12 ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

13 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

14 РМГ 61-2010 ГСИ Показатели точности, правильности, прецизионности количественного химического анализа. Методы оценки.

15 РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

16 МИ 2881-2004 ГСИ. Методики количественного химического анализа. Процедуры проверки приемлемости результатов анализа.

17 ГОСТ 25336-82. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные.

18 ГОСТ 1770-74. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

3 Приписанные характеристики погрешности измерений и ее составляющих

3.1 Методика измерений обеспечивает получение результатов измерений с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в Таблице 1.

Таблица 1 - Диапазон измерений, значения показателей повторяемости, воспроизводимости, точности методики при принятой вероятности $P=0,95$

Продукты животного происхождения	Диапазон измерений массовой концентрации антибиотиков тетрациклиновой группы в определяемых продуктах, мг/кг	Показатель точности (границы суммарной погрешности) $\pm\delta$, %	Показатель повторяемости (среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Степень извлечения вещества, %
1	2	3	4	5	6
Рыба	0,0003-0,0243	1	2,4	3,8	83
Креветки	0,0003-0,0243	1	1,9	3,21	83

1	2	3	4	5	6
Печень, мясо	0,0003-0,0243	2	2,1	4,1	83
Яйца	0,0003-0,0243	22	3,3	5,1	90
Сыр	0,0003-0,0243	23	6,3	8,8	75
Масло сливочное	0,0003-0,0243	23	4,6	5,8	75
Мед	0,0003-0,0243	8	5,2	6,4	80
Молоко	0,0003-0,0243	7	3,4	5,8	83
Сухое молоко,	0,0003-0,0243	7	3,4	5,8	83
Сухие молочные смеси для детского питания	0,0003-0,0243	7	3,4	5,8	83
Сливки	0,0003-0,0243	8	3,1	5,5	85
Кефир	0,0003-0,0243	8	2,9	4,7	85
Йогурт	0,0003-0,0243	7	3,0	5,2	85
Сметана	0,0003-0,0243	7	3,4	6,3	75
Творог	0,0003-0,0243	8	3,9	6,8	75

3.2 Значения показателя точности методики используют при:

- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке качества проведения измерений в лаборатории;
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики

выполнения измерений в конкретной лаборатории.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, растворы и материалы

4.1 Средства измерений

4.1.1 Фотометр планшетный вертикального сканирования, с фильтрами, соответствующими длинам волн 450 нм и 630 нм «Униплан», «Пикон», «Мультискан» или иного типа с теми же характеристиками.

4.1.2 Дозаторы пипеточные автоматические одноканальные с переменным объемом (от 0,02 до 0,2) см³ и (от 0,1 до 1) см³, с допустимой относительной погрешностью не более ±5 %, с одноразовыми наконечниками.

4.1.3 Дозаторы пипеточные автоматические многоканальные с переменным объемом (от 0,05 до 0,3) см³, с допустимой относительной погрешностью не более ±1,5 %, с одноразовыми наконечниками.

4.1.4 Весы неавтоматического действия 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г.

4.1.5 Цилиндры мерные, стаканы химические мерные, вместимостью (25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000) см³.

ГОСТ OIML R 76-1-2011

ГОСТ 1770-74

4.1.6 Градуированные пипетки 2-го класса точности вместимостью (1, 2, 5, 10) см³.

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81)

Примечание – Допускается использование других типов средств измерений, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведенных в п. 4.1.

4.2 Вспомогательное оборудование, лабораторная посуда и материалы

4.2.1 Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (50±1) °С.

4.2.2 Бумага фильтровальная лабораторная.

ГОСТ 12026-76

4.2.3 Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 37 °С с отклонением от заданной не более ±1 °С.

ТУ 9452-002-00141798-97

4.2.4 Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер.

4.2.5 Измельчитель - гомогенизатор или фарфоровые ступки с пестиками.

4.2.6 Устройство для испарения экстрактов или роторный испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °С.

4.2.7 Холодильник бытовой электрический.

ГОСТ 16317-87

4.2.8 Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением до 4000 об/мин и возможностью охлаждения.

4.2.9 Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением до 20000 об/мин.

4.2.10 Шейкер лабораторный для пробирок типа «Вортекс».

4.2.11 Принтер

4.2.12 Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 - 2,0 см³.

4.2.13 Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 см³.

4.2.14 Пластиковые ванночки для реагентов.

4.2.15 Перчатки медицинские одноразовые.

ГОСТ 25250-88

ГОСТ Р 52239-2004 (ИСО 11193-1:2008)

Примечание – Допускается использование других типов посуды, вспомогательного оборудования и материалов, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведенных в п.4.2.

4.3 Реактивы и растворы

4.3.1 Вода дистиллированная

(возможно применение - вода очищенная)

ГОСТ Р58144-2018

ФС.2.2.0020.18

4.3.2 Дезинфицирующее средство на основе ЧАС

ГОСТ Р 56990-2016

(четвертичных аммониевых солей), спиртов, третичных аминов

4.3.3 Н-гексан, ч

ТУ 2631-025-44493179-98

4.3.4 Метанол, хч

ГОСТ 6995-77

4.3.5 Трихлоуксусная кислота (CCl₃COOH), ч

ТУ 6-09-1926-77

Примечание - Допускается использование реактивов и растворов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, в том числе импортных, с квалификацией не ниже указанной в п. 4.3.

4.4 Стандартные образцы

Стандартный раствор тетрациклина ГСО 10164-2012 с концентрацией: 1000000 нг/дм^3 по $1,0 \text{ см}^3$.

4.5 Тест- система для иммуноферментного анализа

4.5.1 Компоненты набора Тест - системы

Набор для количественного определения тетрациклинов по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом, включающий следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсibilизированных тетрациклином, в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Комплект градуировочных растворов тетрациклина с массовыми концентрациями: 24300 нг/дм^3 ; 8100 нг/дм^3 ; 2700 нг/дм^3 ; 900 нг/дм^3 ; 300 нг/дм^3 ; 0 нг/дм^3 по $1,0 \text{ см}^3$ - 6 шт.
3. Конъюгат с пероксидазой хрена, готовый к употреблению - 11 см^3 .
4. Рабочий раствор антител к тетрациклинам - $5,5 \text{ см}^3$.
5. Субстрат реагент А, содержит пероксид карбамида - 6 см^3 .
6. Субстрат реагент В, содержит тетраметилбензидин (ТМБ) - 6 см^3 .
7. Стоп - реагент, содержащий раствор 1н серной кислоты - 6 см^3 .
8. Восстанавливающий буфер, 5-х кратный концентрат - 50 см^3 .
9. Промывающий буфер, приготовленный на основе одно- и двузамещенного фосфата натрия с добавлением твин-20, рН $7,4 \pm 0,5$, 20-ти кратный концентрат - 40 см^3 .
10. Пленка для заклеивания планшета - 4 шт.
11. Фольгированный зип-пакет - 1 шт.
12. Трафарет анализа - 1 шт.
13. Инструкция - 1 шт.

Набор рассчитан на проведение испытаний в 2-х повторностях 42 испытываемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 измерений на один планшет).

4.5.2 Характеристики набора тест-системы.

4.5.2.1 Чувствительность.

Минимальная массовая концентрация тетрациклина, определяемая с помощью набора, составляет $(0,0003 \text{ мг/кг (дм}^3))$.

4.5.2.2 Степень извлечения - $>70\%$.

5 Сущность метода

Измерение массовой концентрации тетрациклинов выполняют методом иммуноферментного анализа. Планшет в наборе сорбирован тетрациклином.

Принцип метода основан на конкуренции в ходе реакции тетрациклина в образцах или стандартах с тетрациклином на твердой фазе за центры связывания с антителами к тетрациклину. В каждую лунку планшета добавляется конъюгат с пероксидазой хрена, не связавшиеся молекулы которого удаляются на этапе отмывки, а также субстрат для ферментативной реакции с изменением цвета. Существует обратная зависимость между значениями оптической плотности образцов и концентрацией тетрациклина. Концентрацию тетрациклина в образцах рассчитывают с помощью калибровочной кривой.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

6.1 Испытания с применением методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсическими, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-систем.

Все компоненты набора, за исключением стоп - реагента и ТМБ, в используемых концентрациях не являются токсичными. Данные реагенты обладают раздражающим действием. В случае попадания какого-либо из этих реагентов на кожу или слизистые покровы следует промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

6.2 При выполнении измерений с помощью фотометра и работе с другими электроприборами необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ Р 12.1.019 и четко следовать указаниям инструкции по эксплуатации прибора.

6.3 Помещение должно быть оснащено приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

6.4 В помещении, где установлены приборы, не должны храниться концентрированные кислоты, а испытания с их применением должны проводиться только под вытяжным шкафом. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать установленных предельно допустимых концентраций в соответствии с ГОСТ 12.1.005.

6.5 Исполнители должны быть проинструктированы о мерах предосторожности при работе с химическими реактивами, электрооборудованием.

6.6 Специальных требований по экологической безопасности не предусмотрено. Все образующиеся в результате выполнения работ отходы (отработанные растворы, реактивы и пр.) утилизируют согласно внутренней Инструкции лаборатории (потребителя) по технике безопасности.

7 Требования к квалификации операторов

Выполнение измерений и обработку полученных результатов должно выполнять лицо с высшим или средним специальным образованием, прошедшее соответствующую подготовку и имеющее навыки работы в области ИФА. Данный персонал должен быть ознакомлен с руководством по эксплуатации планшетного фотометра, освоившего методику испытаний и показавшего удовлетворительные результаты при выполнении процедур контроля качества результатов измерений.

8 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды (25 ± 5) °С;
- атмосферное давление (84,0 - 106,7) кПа или (630-800) мм рт.ст.;
- влажность воздуха (40 – 80) %;
- содержание агрессивных веществ в воздухе не должно превышать санитарных норм;
- напряжение питания сети и частота питающего тока в соответствии с технической документацией на оборудование.

9 Отбор проб

Из образца продукта животного происхождения отбирают пробы для определения содержания остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в соответствии с требованиями, предъявляемыми к отбору проб конкретного продукта. Пробы для испытаний готовят непосредственно перед определением.

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Подготовка оборудования и стеклянной посуды

Перед началом работы рабочие поверхности столов и оборудования обрабатывают 70% этиловым спиртом (не допускать использование перекиси водорода и хлорсодержащих дезинфицирующих растворов). Лабораторную стеклянную посуду моют специальными растворами, многократно промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу.

Обязательно использование сменных наконечников для дозаторов во избежание перекрестной контаминации в ходе испытаний.

Подготовку и проверку фотометра и рН-метра проводят в соответствии с руководством по эксплуатации приборов.

10.2 Подготовка и хранение Тест-системы

Тест-системы для ИФА хранят при температуре (2-8) °С, не допуская подмораживания компонентов. Использовать набор можно только в пределах срока годности.

Перед использованием извлекают набор из холодильника, вскрывают упаковку и выдерживают все реагенты при комнатной температуре (18-25) °С в течение 30 минут (не менее).

10.3 Приготовление растворов и реактивов

Приготовление 1% раствора трихлоруксусной кислоты

В стакан, вместимостью 150 см³, помещают навеску 1 г трихлоруксусной кислоты (CCl₃COOH). Затем, с помощью мерного цилиндра, вместимостью 100 см³, в стакан постепенно добавляют 99,0 см³ дистиллированной воды до полного растворения навески. Раствор тщательно перемешивают.

Приготовление 10%-го раствора метанола

Для получения 10%-го раствора метанола отбирают 10,0 см³ метанола в стакан, вместимостью 150 см³. Затем, с помощью мерного цилиндра, вместимостью 100 см³, в стакан постепенно добавляют 90,0 см³ дистиллированной воды. Раствор тщательно перемешивают.

Приготовление 20%-го раствора метанола

Для получения 20%-го раствора метанола отбирают 20,0 см³ метанола в стакан, вместимостью 150 см³. Затем, с помощью мерного цилиндра, вместимостью 100 см³, в стакан постепенно добавляют 80,0 см³ дистиллированной воды. Раствор тщательно перемешивают.

Приготовление рабочего буферного раствора для восстановления образцов

Для приготовления готового к использованию рабочего буферного раствора для восстановления образцов одну часть 5-кратного концентрата растворяют в четырех частях дистиллированной воды (например, смешивают 10 см³ концентрата и 40 см³ дистиллированной воды для приготовления 50 см³ раствора, готового к употреблению). Тщательно перемешивают. Готовый раствор может храниться при температуре 4 °С в течение 1 месяца.

Приготовление промывающего буферного раствора

Для приготовления готового к использованию промывающего буферного раствора одну часть 20-кратного концентрата растворяют в 19 частях дистиллированной воды (например, смешивают 25 см³ концентрата и 475 см³ дистиллированной воды для приготовления 500 см³ раствора, готового к употреблению). Тщательно перемешивают. Готовый раствор может храниться при температуре 4 °С в течение 1 месяца.

10.4 Приготовление градуировочных растворов тетрациклина

Приготовление раствора тетрациклина с массовой концентрацией

24300 нг/дм³

Для получения раствора тетрациклина с массовой концентрацией 24300 нг/дм³ смешивают в пробирке 2,93 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов и 0,073 см³ высококонцентрированного стандартного раствора тетрациклина с массовой концентрацией 1000000 нг/дм³, тщательно перемешивают.

Приготовление раствора тетрациклина с массовой концентрацией

8100 нг/дм³

Для получения раствора тетрациклина с массовой концентрацией 8100 нг/дм³ смешивают в пробирке 2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов и 1 см³ раствора тетрациклина с массовой концентрацией 24300 нг/дм³, тщательно перемешивают.

Приготовление раствора тетрациклина с массовой концентрацией

2700 нг/дм³

Для получения раствора тетрациклина с массовой концентрацией 2700 нг/дм³ смешивают в пробирке 2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов и 1 см³ раствора тетрациклина с массовой концентрацией 8100 нг/дм³, тщательно перемешивают.

Приготовление раствора тетрациклина с массовой концентрацией

900 нг/дм³

Для получения раствора тетрациклина с массовой концентрацией 900 нг/дм³ смешивают в пробирке 2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов и 1 см³ раствора тетрациклина с массовой концентрацией 2700 нг/дм³, тщательно перемешивают.

Приготовление раствора тетрациклина с массовой концентрацией

300 нг/дм³

Для получения раствора тетрациклина с массовой концентрацией 300 нг/дм³ смешивают в пробирке 2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов и 1 см³ раствора тетрациклина с массовой концентрацией 900 нг/дм³, тщательно перемешивают.

Приготовление раствора тетрациклина с массовой концентрацией

0 нг/дм³ (нулевого стандарта)

Для получения раствора тетрациклина с массовой концентрацией 0 нг/дм³ (нулевого стандарта) отбирают в пустую пробирку 3 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов и используют данный раствор при построении калибровочной кривой.

10.5 Подготовка образцов для испытаний (измерений)

Подготовка образцов тканей: рыбы, креветок, печени, мяса скота и птицы

1) Полностью гомогенизируют всё количество представленного образца в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

2) Взвешивают 2 г измельченного гомогената в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 6 см³ 1% раствора трихлоруксусной кислоты и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 2 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

3) Отбирают 1 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку и добавляют 1 см³ концентрированного метилового спирта и тщательно перемешивают на вортке в течение 1 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

4) Отбирают 1 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

5) Растворяют сухой остаток в 1 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

6) Берут 0,05 см³ жидкости для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 8.

При необходимости для получения результатов массовой концентрации антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

Подготовка образцов меда

1) Взвешивают 1 г меда в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 2 см³ 1% раствора трихлоруксусной кислоты и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 2 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

2) Берут 0,1 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку,

объемом 15 см³, добавляют 0,9 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов, тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек.

3) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 40.

При необходимости для получения результатов массовой концентрации антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

Подготовка образцов яиц

1) Полностью гомогенизируют всё количество представленного образца в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

2) Взвешивают 2 г измельченного гомогената в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 6 см³ 1% раствора трихлоруксусной кислоты и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 2 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

3) Отбирают 1 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку и добавляют 1 см³ концентрированного метилового спирта и тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

4) Отбирают 1 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

5) Растворяют сухой остаток в 1 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

6) Берут 0,05 см³ жидкости для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 8.

При необходимости для получения результатов массовой концентрации антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

Подготовка образцов молока

1) Центрифугируют образец молока при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4-8°С (при отсутствии центрифуги с охлаждением возможно центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике). Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки.

2) Отбирают 1 см³ обезжиренного молока в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 9 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов, тщательно перемешивают встряхиванием в течение 1 мин.

3) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 10.

При необходимости для получения результатов массовой концентрации антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

Подготовка образцов сухого молока, сухие молочные смеси для детского питания

1) 10 г исследуемого сухого продукта разводят в 90 см³ дистиллированной воды, и доводят объем суспензии до 100 см³. Тщательно перемешивают встряхиванием в течение 10 мин до полного растворения сухого молока. Если сухое молоко плохо растворяется, можно увеличить время встряхивания.

2) Центрифугируют молоко при 4000 об/мин в течение 10 мин при 4-8°C. Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки.

3) Отбирают 1 см³ обезжиренного молока в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 9 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов, тщательно перемешивают встряхиванием в течение 1 мин.

4) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 10.

При необходимости для получения результатов массовой концентрации антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

Подготовка образцов молочных продуктов: йогурт (без наполнителя/с фруктами), кефир, творог, сметана, сливки

1) 5,0 г образца вносят в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, инкубируют 15 минут при температуре 50°C на водяной бане, тщательно перемешивают на вортексе до полной гомогенизации.

2) Центрифугируют молоко при 4000 об/мин в течение 10 мин при 4-8 °C. Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки.

3) Отбирают 1 см³ обезжиренного молока в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 9 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов, тщательно перемешивают встряхиванием в течение 1 мин.

4) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 10.

При необходимости для получения результатов массовой концентрации антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

Подготовка образцов молочных продуктов: масло сливочное

1) Взвешивают 1,0 г масла в центрифужную пробирку объёмом 15 см³, расплавляют масло на водяной бане при температуре (40 ± 1) °C. Прибавляют 1 см³ н-гексана и перемешивают тщательно на вортексе в течение 1 мин.

2) Прибавляют 1 см³ 20 %-го раствора метанола и снова тщательно перемешивают на вортексе в течение 10—15 с, затем встряхиванием в течение 10 мин. Центрифугируют в течение 10 мин при 3 000 об/мин при температуре не выше 4 °С.

3) Отбирают 1 см³ из нижней водной фазы в пробирку типа эппендорф на 1,5—2 см³ и помещают пробирку на лед на 10 мин. После чего центрифугируют в течение 10 мин при 20000 об/мин при температуре (20-25) °С.

4) Отбирают нижнюю водную фазу в пустую чистую пробирку и разбавляют рабочим буферным раствором для восстановления образцов в соотношении 1:17 (например: 0,05 см³ нижней фазы + 0,8 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

5) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 20.

При необходимости для получения результатов массовой концентрации антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

Подготовка образцов молочных продуктов: сыр

1) С поверхности образца сыра удаляют плесневый налет (при наличии). Полностью гомогенизируют всё количество представленного образца в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

2) Взвешивают 5,0 г образца в центрифужную пробирку вместимостью 50 см³, прибавляют 20 см³ 10 %-го раствора метанола, тщательно перемешивают в течение 10 мин, встряхивая интенсивно. После чего центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин при температуре не выше 4 °С.

3) Отбирают 1 см³ водной (средней) фазы в другую чистую центрифужную пробирку и центрифугируют при 20 000 об/мин в течение 5 мин при температуре (20-25) °С.

4) Полученную надосадочную жидкость разбавляют рабочим буферным раствором для восстановления образцов в соотношении 1:5 (например: 0,1 см³ нижней фазы + 0,4 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов)

5) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 1.

При необходимости для получения результатов массовой концентрации антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ рабочего буферного раствора для восстановления образцов).

11 Выполнение измерений

Общие требования

1. Раствор субстрата/хромогена светочувствителен, поэтому необходимо избегать попадания на него прямого света. При появлении окрашивания раствора субстрата/хромогена в голубоватый цвет реагент к работе не пригоден.

2. Запрещается использовать реагенты из наборов разных серий или наборов других производителей.

Подготовка тест-системы к использованию

1 Перед использованием извлекают набор из холодильника, вскрывают упаковку и выдерживают все реагенты при температуре (18-25) °С в течение времени не менее 30 минут. Если в концентратах буфера образовались кристаллы, растворяют их путём встряхивания при комнатной температуре перед разведением этих реагентов.

2 Перед выполнением испытания из планшета извлекают необходимое количество стрипов (8 микролунок скрепленных в одну полоску). Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить в холодильник при температуре (2-8) °С.

3 Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

4 После использования реагенты тест-системы сразу убирают в холодильник.

5 На всех стадиях необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

6 Для каждого реактива и раствора используют отдельные съемные наконечники автоматических дозаторов. Внесение растворов в лунки проводят осторожно, не касаясь наконечниками их дна и стенок.

7 Измерение каждого раствора экстрактов испытываемых образцов и градуировочных растворов выполняются в двукратной повторности.

Алгоритм проведения испытаний

При выполнении измерений массовой концентрации тетрациклина проводят следующие операции:

1 **Нумерация.** Вставляют в рамку планшета необходимое количество стрипов. Записывают положение лунок с градуировочными растворами и испытываемыми образцами на трафарете анализа. Градуировочные растворы и образцы необходимо раскапывать в дублях.

2 **Добавление образцов и антител:** добавляют по 0,05 см³ градуировочного раствора каждой массовой концентрации и образцов в выбранные пары лунок, затем добавляют по 0,05 см³ рабочего раствора антител во все лунки. Заклеивают планшет пленкой и осторожно перемешивают в течение 5 секунд. Инкубируют в течение 30 минут при 37 °С в темном месте.

3 **Промывка:** осторожно убирают пленку, удаляют жидкость из каждой лунки путем стряхивания, тщательно выбивая капельки жидкости, оставшиеся в лунке. Немедленно заливают в каждую лунку по 0,25 см³ промывающего буферного раствора. Осторожно перемешивают. Удаляют жидкость из лунок путем стряхивания. Повторяют процедуру промывки 5 раз с интервалом времени в 30 секунд. Переворачивают планшет на чистую фильтровальную бумагу и путем постукивания рамки по столу удаляют остатки жидкости (если в лунках остались пузырьки, используйте чистые наконечники чтобы убрать их).

Примечание: не допускать высыхания лунок в процессе испытаний.

4 **Добавление конъюгата:** добавляют по 0,1 см³ конъюгата в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре 37 °С в темном месте.

5 **Промывка:** повторить пункт 3.

6 **Ферментативная реакция:** после тщательной промывки добавляют по 0,05 см³ раствора субстрата А в каждую лунку, а затем добавляют по 0,05 см³ раствора субстрата В в каждую лунку. Осторожно покачивают планшет в течение 5 сек для тщательного перемешивания. Инкубируют

в течение 15 мин при 37 °С в темноте.

Примечание: время реакции может быть увеличено до получения заметного изменения цвета.

7 Остановка реакции: по окончании инкубации добавляют по 0,05 см³ стоп-реагента в каждую лунку, осторожно перемешивают.

8 Измерение ОП: измеряют значение оптической плотности для каждой лунки при 450 нм с помощью микропланшетного фотометра. Время от внесения стоп-реагента до измерения не должно превышать 10 минут.

12 Обработка (вычисление) и оформление результатов измерений

Обработку результатов измерений выполняют путем измерения оптической плотности содержимого лунок на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Оптическая плотность каждой лунки сравнивается с раствором тетрациклина с массовой концентрацией 0 нг/дм³ (нулевым стандартом), значение которого принимается за 100 %.

Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,5 ($A_{450\text{нм}} < 0,5$), то это указывает на ухудшение качества реагентов. Раствор ТМБ должен быть забракован, если он приобрел окраску до постановки реакции.

12.1 Вычисление результатов измерений

Обработка результатов без программного обеспечения

Рассчитывают средние значения оптической плотности градуировочных растворов и испытываемых образцов, полученных по 2-м параллельным микролунам в результате двух параллельных определений.

Относительную оптическую плотность (A) вычисляют по формуле:

$$A = \frac{B_i}{B_0} \times 100,$$

где:

A - значение относительной оптической плотности, выраженное в процентах от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения;

B_i - среднее значение оптической плотности градуировочных растворов тетрациклина;

B_0 - среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

По величинам значений относительной оптической плотности (% поглощения), вычисленным для градуировочных растворов, и соответствующим им значениям массовой концентрации тетрациклина в нг/дм³ устанавливают градуировочную зависимость и строят градуировочную кривую в полулогарифмической системе координат.

Концентрацию тетрациклина (x) в нг/дм³ считают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности.

Массовую концентрацию (содержание) тетрациклина в испытуемом образце (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{F \times x}{K},$$

где:

X - массовая концентрация тетрациклина в испытуемой пробе образца, мг/кг (мг/дм³ - для жидких продуктов);

x - массовая концентрация тетрациклина в экстракте испытуемой пробы образца, определяемая по градуировочной кривой, нг/дм³;

F - фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 2;

K - коэффициент пересчета нг/дм³ в мг/кг (мг/дм³ - для жидких проб), равный 1000 000.

Таблица 2 Факторы разбавления для расчета содержания тетрациклина в различных пробах

Продукты животного происхождения	Фактор разведения
1	2
Ткани (рыба, креветки, печень, мясо скота и птицы)	8
Мёд	40
Молоко цельное	10
Сухое молоко, сухие молочные смеси для детского питания	10
Яйца	8
Йогурт (без наполнителя/с фруктами), кефир, творог, сметана, сливки	10
Масло сливочное	20
Сыр	1

12.2 Оформление результатов измерений

12.2.1 Результат измерений представляют в виде:

$$(\bar{X} \pm \Delta) \text{ мг/кг при вероятности } P = 0,95,$$

где:

\bar{X} - среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ - граница абсолютной погрешности, мг/кг:

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot X,$$

где:

δ - граница относительной погрешности методики. Значения показателя точности δ приведены в таблице 1 (показатель точности в соответствии с диапазоном массовых концентраций, таблица 1), %.

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат измерений представляют в виде:

- содержание тетрациклина в молоке < 0,0003 мг/кг >>

Численные значения результатов измерений должны оканчиваться цифрой того же разряда, что и значения характеристики погрешности, которые не должны содержать более двух значащих цифр.

12.2.2 Допустимо представлять результат в виде

$$X \pm \Delta_{\text{л}} \text{ при условии } \Delta_{\text{л}} < \Delta,$$

где:

$\pm \Delta_{\text{л}}$ – границы погрешности результатов измерений при $P=0,95$, установленные при реализации методики в лаборатории и обеспечиваемые контролем стабильности результатов измерений.

12.2.3 Результаты измерений оформляют протоколом или записью в журнале, по формам, приведенным в документах СМК лаборатории.

13 Контроль качества результатов измерений

13.1 Общие положения

13.1.1 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки повторяемости при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (среднеквадратического отклонения погрешности).

13.1.2 Для методик измерений, используемых постоянно, периодичность контроля качества результатов измерений устанавливают в зависимости от общего числа испытываемых рабочих проб за месяц.

13.2 Оценка показателя повторяемости методики измерений

13.2.1 Оперативный контроль повторяемости проводят с использованием рабочих проб при проведении параллельных измерений для получения результата испытаний (измерений), как среднего значения.

13.2.2 Оперативный контроль повторяемости проводят путем сравнения расхождения «n» результатов параллельных измерений, полученных при испытании (измерении) пробы с нормативом повторяемости r .

Повторяемость результатов параллельных измерений признают удовлетворительной, если:

$$r_{\text{к}} = X_{\text{max}} - X_{\text{min}} \leq r,$$

где:

r – норматив повторяемости, указанный в МИ.

Если норматив не указан, то он рассчитывается по формуле:

$$r = Q(P, n) * \sigma_r,$$

где:

σ_r – показатель повторяемости (среднее квадратическое отклонение повторяемости, соответствующая содержанию компонента в пробе).

$$Q(P, n) = 2,77 \quad \text{при } n=2, P=0,95;$$

$$Q(P, n) = 3,31 \quad \text{при } n=3, P=0,95;$$

$$Q(P, n) = 3,63 \quad \text{при } n=4, P=0,95;$$

$$Q(P, n) = 3,86 \quad \text{при } n=5, P=0,95.$$

Если $r_k \leq r$, то повторяемость результатов параллельных измерений признают удовлетворительной.

При невыполнении условия эксперимент повторяют. При повторном невыполнении условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

Значение предела повторяемости приведены в таблице №3.

Таблица 3-Диапазон измерений, значения пределов повторяемости при доверительной вероятности $P=0,95$

Продукты животного происхождения	Диапазон измерений массовой концентрации тетрациклина в определяемых продуктах, мг/кг	Предел повторяемости (относительное значение допустимого расхождения между двумя параллельными результатами измерений), г, %
1	2	3
Рыба	0,0003-0,0243	6
Креветки	0,0003-0,0243	5
Печень, мясо	0,0003-0,0243	6
Яйца	0,0003-0,0243	9
Сыр	0,0003-0,0243	17
Масло сливочное	0,0003-0,0243	12
Мёд	0,0003-0,0243	14
Молоко	0,0003-0,0243	9
Сухое молоко	0,0003-0,0243	9
Сухие молочные смеси для детского питания	0,0003-0,0243	9
Сливки	0,0003-0,0243	9
Кефир	0,0003-0,0243	8
Йогурт	0,0003-0,0243	8
Сметана	0,0003-0,0243	9
Творог	0,0003-0,0243	10

14 Проверка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости

14.1 Проверка приемлемости проводится при необходимости сравнения результатов измерений, полученных двумя лабораториями

Расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости R . При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений и в качестве окончательного может быть использовано их общее среднее значение.

Значения пределов воспроизводимости приведены в таблице №4

Таблица 4-Диапазон измерений, значения пределов воспроизводимости при доверительной вероятности P=0,95

Продукты животного происхождения	Диапазон измерений массовой концентрации тетрациклина в определяемых продуктах, мг/кг	Предел воспроизводимости (допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений, полученных в разных лабораториях при P=0,95), R, %
1	2	3
Рыба	0,0003-0,0243	10
Креветки	0,0003-0,0243	9
Печень, мясо	0,0003-0,0243	11
Яйца	0,0003-0,0243	14
Сыр	0,0003-0,0243	24
Масло сливочное	0,0003-0,0243	16
Мед	0,0003-0,0243	18
Молоко	0,0003-0,0243	16
Сухое молоко	0,0003-0,0243	16
Сухие молочные смеси для детского питания	0,0003-0,0243	16
Сливки	0,0003-0,0243	15
Кефир	0,0003-0,0243	13
Йогурт	0,0003-0,0243	14
Сметана	0,0003-0,0243	17
Творог	0,0003-0,0243	19

14.2 При превышении предела воспроизводимости могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно ГОСТ Р ИСО 5725 - 6 (раздел 5) или МИ 2881.

Примечание – Периодичность оперативного контроля процедуры измерений, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируют во внутренних документах лаборатории.

Ключевые слова: методика измерений, метод иммуноферментного анализа, тест-системы производства «Иммунотэкс», массовая концентрация тетрациклина, продукция животного происхождения.

Руководитель разработки и исполнитель:

Начальник научного отдела

ООО НПО «Иммунотэкс»,

кандидат биологических наук, доцент

А.А. Филь

Утверждена:

Первым заместителем генерального директора

ФБУ «Ростовский ЦСМ»



В.А. Романов

Свидетельство об аттестации
методики измерений

№ 003-01.00281-2013-2023
от 01.02.2023 г.

Руководитель
предприятия-разработчика:

Директор ООО НПО «Иммунотэкс»



М.В. Батурин