

**ИП2011 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МЕТРОНИДАЗОЛА МЕТОДОМ ИФА**

ИНСТРУКЦИЯ



ОГЛАВЛЕНИЕ

1. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА.....	3
2. ПРИНЦИП ТЕСТА И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА.....	4
3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
4. СОСТАВ НАБОРА	5
5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ	6
6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ	6
7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ	7
8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	8
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	12
10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА	14
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ	16
12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА.....	17
13. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В РАБОТЕ НАБОРА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ	18
14. ПРИМЕЧАНИЕ.....	20

1. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА.



- дата изготовления.



- годен до.



- изготовитель.



- номер серии.



- каталожный номер.



- температурный диапазон хранения.

2. ПРИНЦИП ТЕСТА И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор основан на конкурентном методе ИФА. Он позволяет определить метронидазол в таких образцах, как ткани, мёд, яйца, молоко и др.

В ходе реакции метронидазол в образцах или стандартах конкурирует с метронидазолом на твёрдой фазе за центры связывания антител к метронидазолу. Затем в каждую лунку планшета добавляется конъюгат с пероксидазой хрена, а также ТМБ для ферментативной реакции. Существует обратная зависимость между значениями оптической плотности образцов и концентрацией метронидазола. Концентрацию метронидазола в образцах можно рассчитать с помощью стандартной кривой.



- не для использования в клинической лабораторной диагностике.
- внимательно прочитайте инструкцию до использования набора.

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Анализируемые образцы: ткани, мёд, яйца, молоко и т.д.

Чувствительность: 1,5 мкг/кг.

Режим реакции: при 25 °С, 30 минут - 30 минут - 15 минут.

Нижний предел чувствительности:

- ткани, мёд, молоко - 1,5 мкг/кг;

- яйца - 3 мкг/кг.

Кросс-реактивность:

- метронидазол - 100%;

- диметридазол - 68%.

Степень извлечения:

- для образцов всех типов - 90%±10%.

Количество тестов: 96.

4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированным метронидазолом.	1 шт.	-
2.	Стандартные растворы с концентрацией метронидазола:*		
	- 0 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 1,5 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 3 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 6 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 12 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 24 мкг/кг.	1 шт.	1 мл
3.	Конъюгат с пероксидазой хрена.	1 шт.	11 мл
4.	Рабочий раствор антител.	1 шт.	5,5 мл
5.	Субстрат А.	1 шт.	6 мл
6.	Субстрат В.	1 шт.	6 мл
7.	Стоп-реагент.	1 шт.	6 мл
8.	Промывающий буфер, 20-кратный концентрат.	1 шт.	40 мл
9.	Восстанавливающий буфер, 2-кратный концентрат.	1 шт.	50 мл
10.	Плётка для заклейки планшета.	4 шт.	-

* - концентрации считать условными в пересчете на сухое вещество.

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
11.	Зип-пакет (запасной).	1 шт.	-
12.	Трафарет.	1 шт.	-
13.	Инструкция.	1 шт.	-

5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ

Оборудование и материалы: микропланшетный ридер, принтер, весы, гомогенизатор, азотный испаритель, шейкер, вортекс, центрифуга, водяная баня, рН-метр, холодильник, высокоточные дозаторы (одно- и многоканальные) с переменным объёмом дозирования, мерные цилиндры, пробирки, фильтровальная бумага.

Реагенты: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Н-гексан, этилацетат, деионизированная или дистиллированная вода, 0,1 М раствор NaOH и 0,1 М раствор HCl (для корректировки рН растворов).



- допускается использование других типов посуды, оборудования и материалов с аналогичными функциональными свойствами.

6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

6.1. Отобрать необходимое количество стрипов планшета с сорбированным метронидазолом.



- все неиспользованные стрипы планшета как можно скорее поместить в запасной зип-пакет (с расположенным внутри влагопоглотителем) и хранить далее при температуре 2-8 °С.

6.2. Реагенты, входящие в состав набора, стрипы планшета и анализируемые образцы перед проведением исследования довести до комнатной температуры (25 °С).

6.3. Заранее включить микропланшетный ридер (чтобы прибор прогрелся) и настроить параметры считывания.



- все используемое оборудование и материалы должны быть чистыми;
- деионизированная или дистиллированная вода не должна иметь признаки контаминации;
- дозаторы должны быть снабжены сменными наконечниками во избежание перекрёстной контаминации в ходе эксперимента.



7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

7.1. Приготовление 0,1 М раствора фосфатного буфера (для образцов тканей и мёда).

Растворить 4,66 г Na_2CO_3 и 0,5 г NaHCO_3 в 500 мл деионизированной или дистиллированной воды. Тщательно перемешать. Довести рН полученного раствора до 10,6.

7.2. Приготовление рабочего раствора восстанавливающего буфера.

Разбавить восстанавливающий буфер 2-кратный концентрат деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:1 соответственно.

7.3. Приготовление рабочего раствора промывающего буфера.

В мерный цилиндр отлить необходимое количество промывающего буфера 20-кратного концентрата. В случае наличия в растворе кристаллов, осторожно перемешать его при комнатной температуре до тех пор, пока кристаллы полностью не растворятся. После чего разбавить промывающий буфер 20-кратный концентрат деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:19 соответственно.

8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

8.1. Подготовка тканей и мёда.

8.1.1. Удалить жир из образцов тканей.

8.1.2. Измельчить образец до однородной массы (гомогената).

8.1.3. Взвесить $3 \pm 0,05$ г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.1.4. Добавить в пробирку 3 мл 0,1 М раствора фосфатного буфера (п. 7.1.).

8.1.5. Перемешать на вортексе пока образец полностью не растворится.

8.1.6. Добавить 9 мл этилацетата.

8.1.7. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

8.1.8. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

8.1.9. Отобрать 3 мл чистой надосадочной жидкости в чистую стеклянную пробирку.

8.1.10. Высушить при 55-60 °С с помощью азотного испарителя или на водяной бане.



п. 8.1.10. проводить в вентилируемом помещении.

8.1.11. Добавить 1 мл Н-гексана.

8.1.12. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

8.1.13. Добавить 0,5 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.2.).

8.1.14. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

8.1.15. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

8.1.16. Удалить верхний органический слой жидкости.

8.1.17. Взять 100 мкл из нижнего слоя для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образцов - 0,5; мини-

мально определяемая концентрация - 1,5 мкг/кг.

8.2. Подготовка яиц.

8.2.1. Перемешать яйца до получения однородной массы (гомогената).

8.2.2. Взвесить $3 \pm 0,05$ г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.2.3. Добавить в пробирку 9 мл этилацетата.

8.2.4. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

8.2.5. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре.

8.2.6. Отобрать 3 мл чистой надосадочной жидкости в чистую стеклянную пробирку.

8.2.7. Высушить при 55-60 °С с помощью азотного испарителя или на водяной бане.

8.2.8. Добавить 2 мл Н-гексана.

8.2.9. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

8.2.10. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.2.).

8.2.11. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

8.2.12. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

8.2.13. Удалить верхний органический слой жидкости.

8.2.14. Взять 100 мкл из нижнего слоя для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 1; минимально определяемая концентрация - 3 мкг/кг.

8.3. Подготовка молока.

8.3.1. Гомогенизировать образец молока.

8.3.2. Отобрать 3 мл гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.3.3. Добавить в пробирку 9 мл этилацетата.

8.3.4. Перемешать на вортексе в течение 2 минут.

8.3.5. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

8.3.6. Отобрать 3 мл чистой надосадочной жидкости в чистую стеклянную пробирку.

8.3.7. Высушить при 55-60 °С с помощью азотного испарителя или на водяной бане.

8.3.8. Добавить 2 мл Н-гексана.

8.3.9. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

8.3.10. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.2.).

8.3.11. Перемешать на вортексе в течение 2 минут.

8.3.12. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

8.3.13. Удалить верхний органический слой жидкости.

8.3.14. Взять 100 мкл из нижнего слоя для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 1; минимально определяемая концентрация - 1,5 мкг/кг.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Нумерация.

Пронумеровать анализируемые образцы по порядку. Составить схему расположения стандартов и анализируемых образцов на трафарете, входящем в состав набора.

Стандарты и образцы рекомендуется тестировать в дублях для повышения достоверности.

9.2. Добавление реагентов.

В лунки планшета внести по 100 мкл стандартов и образцов (в соответствии со схемой), добавить по 50 мкл рабочего раствора антител в каждую лунку. Заклеить планшет плёнкой. Аккуратно шейкировать планшет в течение 5 секунд, затем инкубировать его в течение 30 минут при 25 °С **в темноте.**

9.3. Осторожно снять плёнку. Удалить жидкость из лунок планшета путём стряхивания.

9.4. Промывка.

Немедленно добавить во все лунки планшета по 300 мкл рабочего раствора промывающего буфера (п. 7.3.) и оставить на 30 секунд, после чего удалить жидкость путём стряхивания. **Процедуру промывки провести всего 5 раз.**

9.5. После окончания последней промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Если в лунках остались пузырьки, удалить их, используя сменные наконечники.

9.6. Добавление конъюгата.

Добавить 100 мкл конъюгата с пероксидазой хрена в каждую лунку. Заклеить планшет плёнкой. Инкубировать планшет в течение 30 минут при 25 °С **в темноте**.

9.7. Промывка.

Повторить п. 9.3.-9.5.

9.8. Ферментативная реакция.

Добавить по 50 мкл субстрата А, а затем по 50 мкл субстрата В в каждую лунку. Аккуратно шейкировать планшет в течение 5 секунд, затем инкубировать его в течение 15 минут при 25 °С **в темноте**.

Примечание: если голубой цвет лунок слишком бледный, можно продлить время инкубации.

9.9. Остановка реакции.

Добавить по 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Осторожно и тщательно шейкировать планшет.

9.10. Измерение оптической плотности (ОП).

Измерить значение ОП для каждой лунки при 450 нм с помощью микропланшетного ридера (по возможности, рекомендуется проводить измерение ОП относительно длины

волны сравнения - 630 нм). Время от внесения стоп-реагента до измерения ОП не должно превышать 10 минут.



- после проведения анализа, оставшиеся реагенты необходимо хранить при температуре 2-8 °С **плотно** закрытыми, во избежание испарения или микробной контаминации.

10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

10.1. Рассчитать средние значения оптической плотности стандартов и исследуемых образцов, полученные по 2 параллельным лункам в результате двух параллельных измерений.

10.2. Оптическую плотность каждой лунки сравнить с нулевым стандартом (значение которого принимается за 100%), определив процент поглощения по формуле:

$$A = B_i / B_0 * 100, \text{ где}$$

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

B_i - среднее значение оптической плотности каждого из стандартных растворов метронидазола или исследуемого образца;

B₀ - среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

10.3. Построение калибровочной кривой.

По величинам значений относительной оптической плот-

ности, вычисленным для стандартных растворов (п. 10.2.), и соответствующим им значениям концентрации метронидазола в мкг/кг (0; 1,5; 3; 6; 12; 24) построить калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат (например, рис. 1).

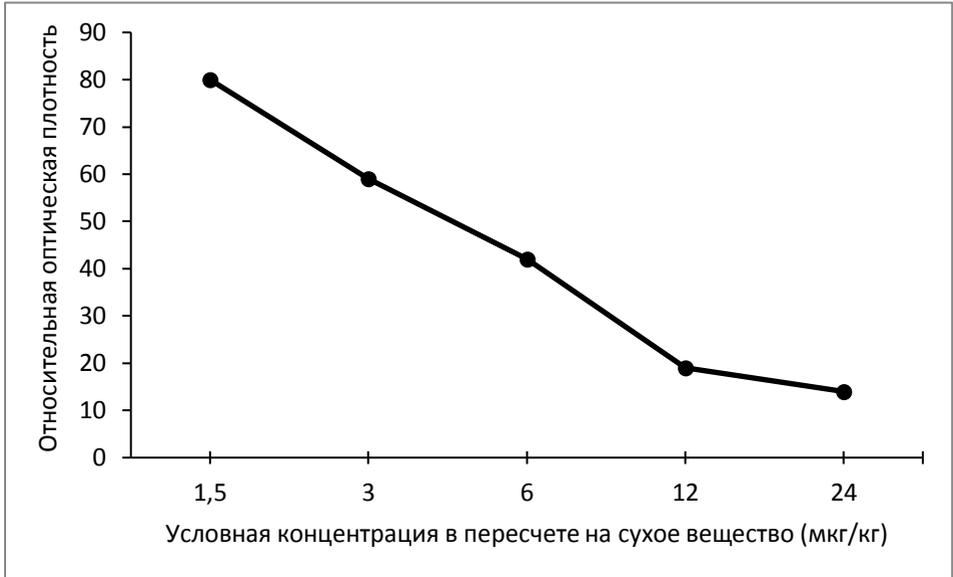


Рис. 1. Пример калибровочной кривой.

10.4. Нахождение концентрации метронидазола в анализируемых образцах.

Концентрацию метронидазола (x) в мкг/кг считать по калибровочной кривой, после чего обязательно умножить её на фактор разведения (указан для каждого типа образцов при его подготовке).

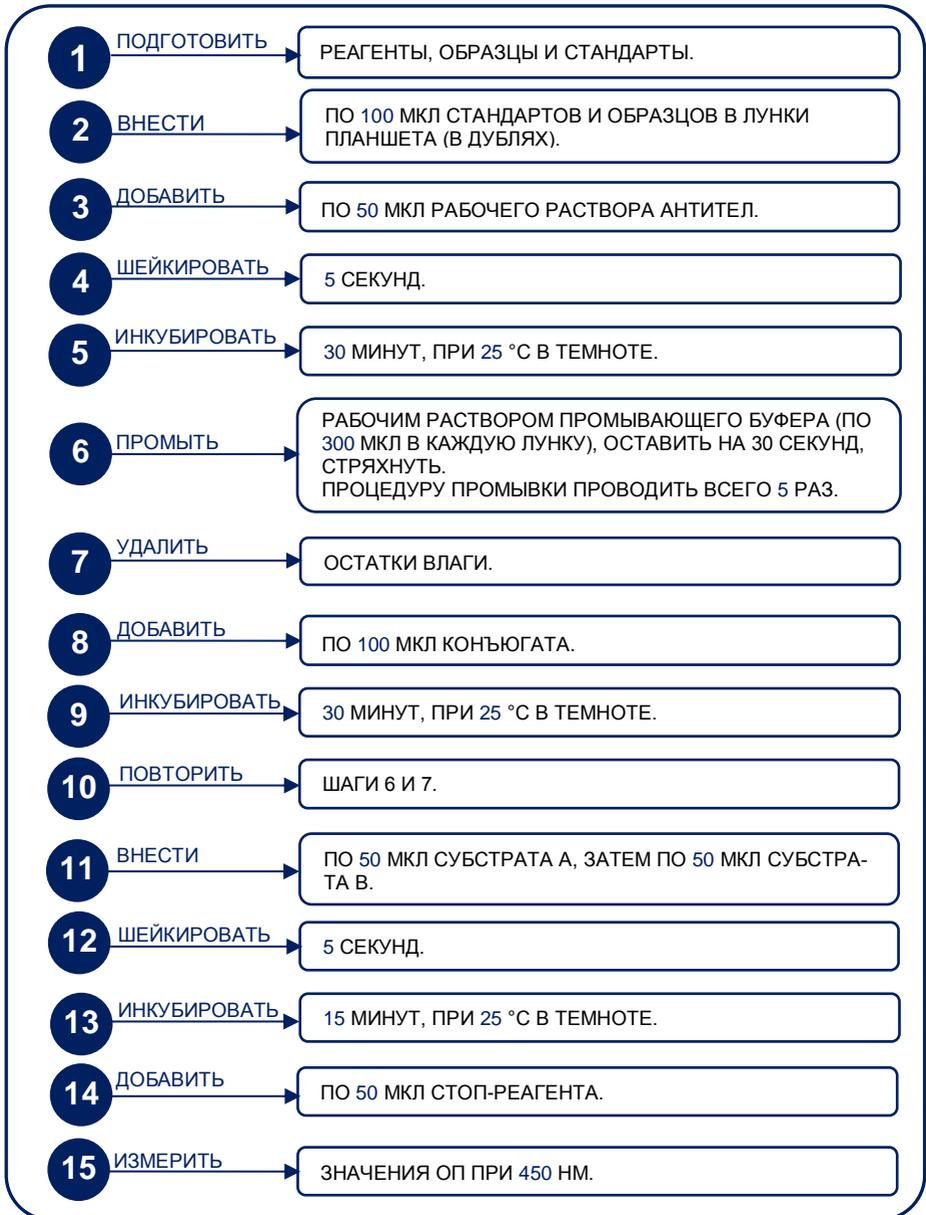
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

11.1. Невскрытые компоненты набора хранить при температуре 2-8 °С в течение 1 года с даты изготовления. Избегать замораживания!

11.2. Открытый набор (включая неиспользованные стрипы планшета) хранить при температуре 2-8 °С, защищая от света и влажности. Срок хранения открытого набора - 1 месяц.

11.3. Дата изготовления и срок годности набора указаны на упаковке.

12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА



Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

13. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В РАБОТЕ НАБОРА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ.

Проблема	Возможная причина	Корректирующее действие
Неправильная стандартная кривая.	Неправильное построение стандартной кривой.	Обеспечьте точность при выполнении операций во время разведения.
	Плохое качество выполнения процедуры промывки. Недостаточно тщательное удаление остатка влаги после процедуры промывки.	Выполняйте процессы промывки и аспирации лунок в точном соответствии с инструкцией.
	Погрешности в дозировании.	Используйте в работе дозаторы, прошедшие периодическую поверку. Проведите калибровку дозаторов.
Низкая точность.	Недостаточная промывка лунок планшета.	Выполняйте промывку в точном соответствии с инструкцией.
	Недостаточное смешивание и аспирация реагентов.	Обеспечьте адекватное смешивание и аспирацию реагентов.
	Повторное использование наконечников для дозаторов, ёмкостей для реагентов и плёнок для заклейки планшетов.	Используйте наконечники, ёмкости для реагентов и плёнки для заклейки планшетов однократно.
	Погрешности в дозировании.	Используйте в работе дозаторы, прошедшие периодическую поверку.

		ку. Проведите калибровку дозаторов.
Низкие значения оптических плотностей.	Нарушения в дозировке при внесении реагентов.	Используйте в работе дозаторы, прошедшие периодическую поверку. Проведите калибровку дозаторов.
	Несоблюдение времени инкубации.	Тщательно следите за временем инкубации планшета.
	Несоблюдение температуры инкубации.	Тщательно следите за температурой инкубации планшета.
	Проблемы с конъюгатом и/или субстратами А и В.	Смешайте конъюгат и субстраты, должно немедленно произойти изменение цвета.
	Не был добавлен стоп-реагент.	Не нарушайте процедуру проведения анализа.
	Было превышено время от внесения стоп-реагента до измерения ОП.	Не нарушайте процедуру проведения анализа.
Неправильные значения.	Неправильное хранение образцов.	Соблюдайте сроки и температуру хранения образцов, используйте свежие образцы.
	Неправильный сбор и подготовка образцов к анализу.	Чётко следуйте указаниям инструкции по применению.
	Низкая концентрация метронидазола в образцах.	Используйте новые образцы и повторите анализ.

14. ПРИМЕЧАНИЕ



ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ СЛЕДУЕТ УЧИТЫВАТЬ, ЧТО:

- если не довести реагенты перед анализом до комнатной температуры - значения оптической плотности будут понижены. Аналогичный результат будет при температуре в помещении ниже 25 °С;
- нельзя допускать высыхания лунок во время процедуры промывки, так как это неизбежно приведет к получению плохой стандартной кривой и плохой воспроизводимости. После промывки незамедлительно переходите к следующему шагу;
- необходимо тщательно промывать планшет. Качество выполнения процедуры промывки может сильно повлиять на качество работы набора;
- нужно заклеивать планшет специальной пленкой. Избегать нахождения реагентов на ярком свете;
- недопустимо использовать реагенты с истекшим сроком годности, реагенты из разных серий и реагенты других производителей;
- субстрат А и субстрат В должны быть забракованы, если они приобрели голубую окраску;
- если значение ОП стандарта с концентрацией метронидазола 0 мкг/кг меньше 0,5 ед. опт. плотн., это указывает на ухудшение качества реагента;
- стоп-реагент является едким! Избегайте его попадания на кожу и в глаза;
- поскольку значения ОП стандартов могут варьироваться в зависимости от условий проведения анализа (например, лаборант, техника пипетирования и промывки, температура), рекомендуется строить стандартную кривую для каждого анализа;
- даже один и тот же лаборант может получить разные результаты в двух отдельных экспериментах. Чтобы получить воспроизводимые результаты, необходимо контролировать работу на каждом этапе анализа;
- если используемый Вами тип образцов не указан в инструкции, необходим предварительный эксперимент для определения обоснованности и возможности применения набора.