

**ИП2020 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ХИНОЛОНОВ 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 .....	6
5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ .....	7
6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ.....	7
7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ .....	8
8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....	9
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 хинолоны в таких образцах, как ткани, мёд, молоко, сухое молоко, яйца, моча и др.

В ходе реакции хинолоны в образцах или стандартах конкурирует с хинолонами на твёрдой фазе за центры связывания антител к хинолонам. 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 хинолонов. Концентрацию хинолонов 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, молоко, сухое молоко, яйца, моча и т.д.

**Чувствительность:** 0,1 мкг/кг.

**Специфичность:** данный набор отличается высокой специфичностью обнаружения хинолонов.

**Кросс-реактивность:** Энрофлоксацин - 100%;

Норфлоксацин - 240%;

Ципрофлоксацин - 243%;  
Ломифлоксацин - 172%;  
Флуоромеквин - 80%;  
Пефлоксацин - 210%;  
Дальфлоксацин - 110%;  
Сарафлоксацин - 36%;  
Дифлоксацин - 84%;  
Эноксацин - 66%;  
Офлоксацин - 51%;  
Оксаквиновая кислота - 106%;  
Левифлоксацин - 3%;  
Мапрофлоксацин - 4%.

**Стабильность:** стабильность набора определяется степенью потери активности. Для данного набора степень потери активности составляет менее 5% на момент истечения срока годности при соблюдении условий хранения. Для минимизации влияния на качество анализа операционные процедуры и условия в лаборатории, в частности, температура, влажность воздуха, температура инкубации должны строго контролироваться. Кроме того, рекомендуется, чтобы один анализ от начала и до конца проводил один и тот же специалист.

**Степень извлечения:**

- ткани (80-98%);
- мёд (79-95%);
- молоко (73-99%);

- сухое молоко (81-99%);
- яйца (77-99%).

**Количество тестов:** 96.

#### 4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированными хинолонами.	1 шт.	-
2.	Высококонцентрированный стандарт с концентрацией хинолонов 100 мкг/кг.*	1 шт.	1 мл
3.	Стандартные растворы с концентрацией хинолонов:* - 0 мкг/кг; - 0,1 мкг/кг; - 0,3 мкг/кг; - 0,9 мкг/кг; - 2,7 мкг/кг; - 8,1 мкг/кг.	1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт.	1 мл 1 мл 1 мл 1 мл 1 мл 1 мл
4.	Конъюгат с пероксидазой хрена.	1 шт.	5,5 мл
5.	Рабочий раствор антител.	1 шт.	5,5 мл
6.	Субстрат А.	1 шт.	6 мл
7.	Субстрат В.	1 шт.	6 мл
8.	Стоп-реагент.	1 шт.	6 мл
9.	Промывающий буфер, 20-кратный концентрат.	1 шт.	40 мл
10.	Восстанавливающий буфер, 5-кратный концентрат.	1 шт.	50 мл
11.	Плётка для заклейки планшета.	4 шт.	-
12.	Зип-пакет (запасной).	1 шт.	-
13.	Трафарет.	1 шт.	-
14.	Инструкция.	1 шт.	-

\* - концентрации считать условными в пересчете на сухое вещество.

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

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

**Реагенты:** безводный ацетонитрил, Н-гексан, дихлорметан, концентрированная соляная кислота, деионизированная или дистиллированная вода.

## 6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

6.1. Отобрать необходимое количество стрипов планшета с сорбированными хинолонами, хранящихся при температуре минус 20 °С.



- 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 накопечниками во избежание перекрёстной контаминации в ходе эксперимента.



## 7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

### 7.1. Приготовление 0,15 М раствора соляной кислоты.

Разбавить 5 мл концентрированной соляной кислоты в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 400 мл. Тщательно перемешать.

### 7.2. Приготовление раствора для экстракции образцов.

Добавить 10 мл 0,15 М раствора соляной кислоты (п. 7.1.) к 90 мл безводного ацетонитрила. Тщательно перемешать.

### 7.3. Приготовление рабочего раствора восстанавливающего буфера.

Разбавить восстанавливающий буфер 5-кратный концентрат деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:4 соответственно.

### 7.4. 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 комнат-



ной температуре до тех пор, пока кристаллы полностью не растворятся. Для приготовления 800 мл рабочего раствора промывающего буфера необходимо разбавить 40 мл промывающего буфера (20-кратного концентрата) 760 мл деионизированной или дистиллированной воды.

## **8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

### **8.1. Подготовка тканей.**

8.1.1. Измельчить образец до однородной массы (гомогената).

8.1.2. Взвесить  $2 \pm 0,05$  г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.1.3. Добавить в пробирку 8 мл раствора для экстракции образцов (п. 7.2.).

8.1.4. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

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

8.1.6. Отобрать 2 мл верхнего органического слоя жидкости в другую пробирку и высушить с помощью азотного испарителя при температуре 50-60 °С.

8.1.7. Растворить сухой остаток в 1 мл Н-гексана.

8.1.8. Тщательно перемешать на вортексе в течение 2 минут.

8.1.9. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.). Тщательно перемешать в течение 30 секунд.

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

8.1.11. Удалить верхний слой Н-гексана.

8.1.12. Взять 50 мкл раствора из нижнего слоя для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 2.**

## **8.2. Подготовка мёда.**

8.2.1. Взвесить  $1 \pm 0,05$  г мёда и поместить его в центрифужную пробирку.

8.2.2. Добавить в пробирку 6 мл раствора для экстракции образцов (п. 7.2.).

8.2.3. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

8.2.4. Добавить сначала 3 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.), а затем - 11 мл дихлорметана.

8.2.5. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

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

8.2.7. Удалить верхний слой жидкости.

8.2.8. Отобрать 8 мл из нижнего органического слоя в другую пробирку и высушить с помощью азотного испарителя при температуре 50-60 °С.

8.2.9. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.) и 1 мл Н-гексана.

8.2.10. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

8.2.11. Центрифугировать при 3000 об/мин в течение 5 минут

при комнатной температуре.

8.2.12. Удалить жидкость из верхнего слоя.

8.2.13. Отобрать 50 мкл жидкости из нижнего слоя для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 2.**

### **8.3. Подготовка молока.**

8.3.1. Смешать 25 мкл молока и 475 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.).

8.3.2. Тщательно перемешать на вортексе 1 минуту.

8.3.3. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 20.**

### **8.4. Подготовка сухого молока.**

8.4.1. Взвесить  $0,5 \pm 0,02$  г сухого молока и поместить его в центрифужную пробирку.

8.4.2. Добавить в пробирку 5 мл деионизированной или дистиллированной воды и перемешать до полного растворения.

8.4.3. 100 мкл полученного раствора (п. 8.4.2.) добавить к 400 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.).

8.4.4. Перемешать на вортексе 1 минуту.

8.4.5. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 50.**

### **8.5. Подготовка яиц.**

8.5.1. Перемешать яйца до однородной массы (гомогената).

8.5.2. Взвесить  $1 \pm 0,02$  г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.5.3. Добавить в пробирку 5 мл деионизированной или дистиллированной воды и перемешать до полного растворения.

8.5.4. 100 мкл полученного раствора (п. 8.5.3.) добавить к 400 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.).

8.5.5. Перемешать на вортексе 1 минуту.

8.5.6. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 30.**

## 8.6. Подготовка мочи.



- если образец мочи мутный, его необходимо предварительно профильтровать либо центрифугировать, пока он не станет прозрачным.

8.6.1. 1 мл прозрачного образца мочи добавить к 4 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.).

8.6.2. Перемешать на вортексе 30 секунд.

8.6.3. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 5.**

## 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 50 мкл стандартов и образцов (в соответствии со схемой), добавить по 50 мкл конъюгата во все лунки, а затем - по 50 мкл рабочего раствора антител в каждую лунку. Заклеить планшет плёнкой. Аккуратно шейкировать планшет в течение 5 секунд, затем инкубировать его в течение 45 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 350 мкл рабочего раствора промывающего буфера (п. 7.4.) 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. 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.**

#### 9.7. Остановка реакции.

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

#### 9.8. 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:

$$A = B_i / B_0 * 100, \text{ где}$$

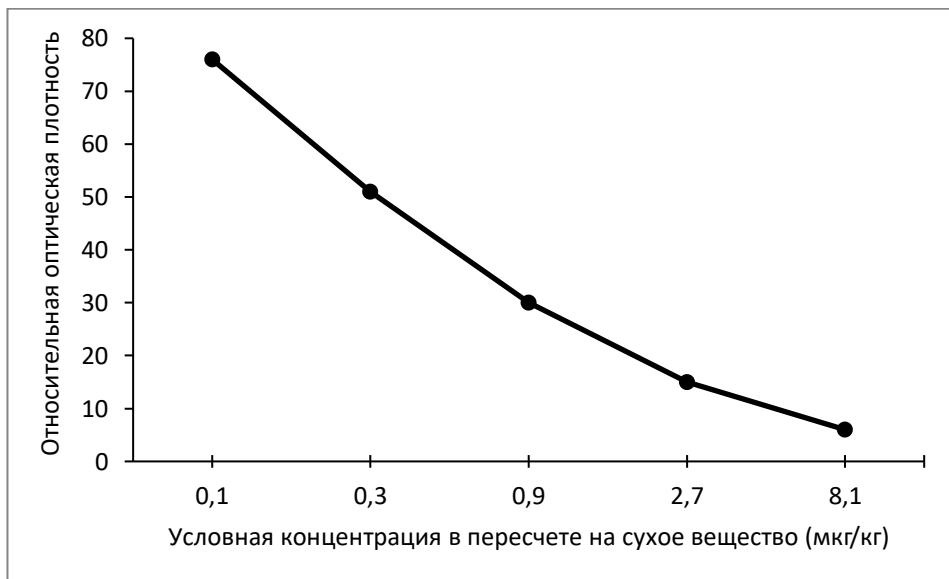
*A* - значение относительной оптической плотности, выраженное в процентах, от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения;

*B<sub>i</sub>* - среднее значение оптической плотности каждого из стандартных растворов хинолонов или исследуемого образца;

*B<sub>0</sub>* - среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

### 10.3. Построение калибровочной кривой.

По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов (п. 10.2.), и соответствующим им значениям концентрации хинолонов в мкг/кг (0; 0,1; 0,3; 0,9; 2,7; 8,1) построить калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат (например, рис. 1).



**Рис. 1. Пример калибровочной кривой.**

#### **10.4. Нахождение концентрации хинолонов в анализируемых образцах.**

Концентрацию хинолонов (х) 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 (за исключением планшета) хранить при температуре 2-8 °С в течение 1 года с даты изготовления. Избегать замораживания!

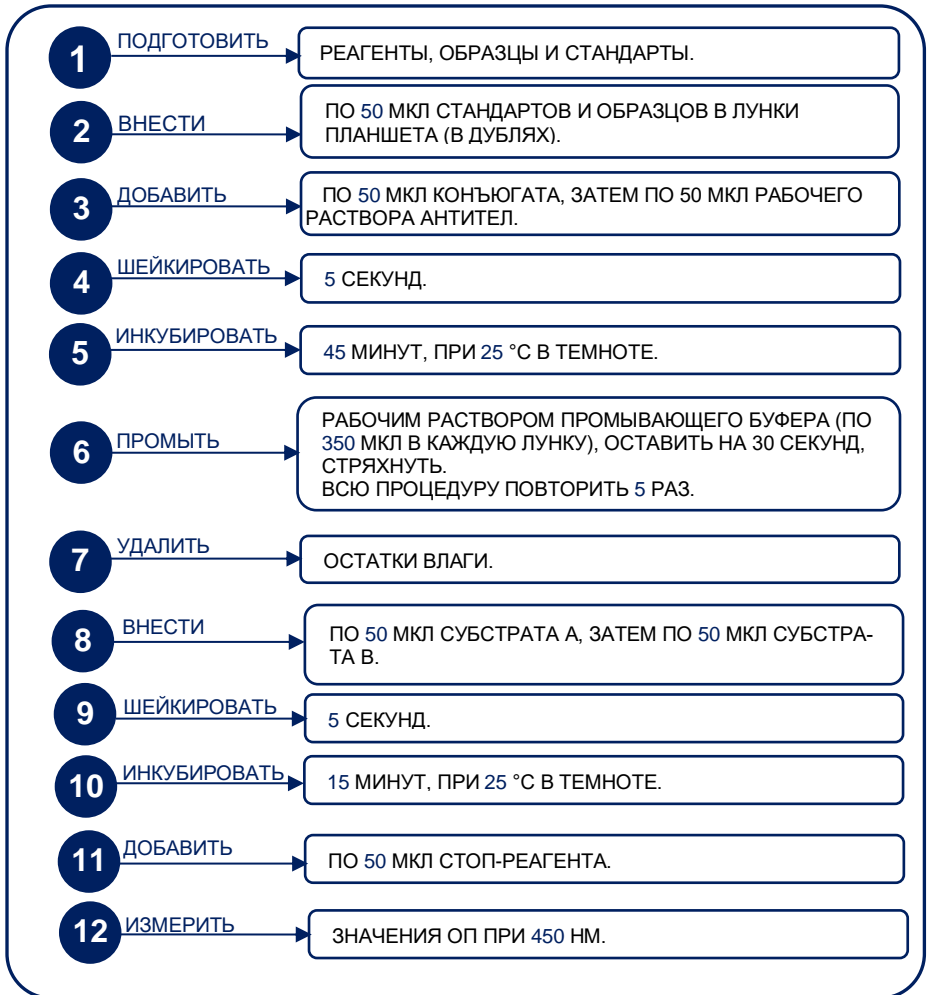
11.2. Планшет хранить отдельно от остальных компонентов при температуре минус 20 °С в течение 1 года с даты изготовления.

11.3. Открытый набор (включая неиспользованные стрипы планшета) хранить при температуре 2-8 °С, защищая от света и влажности. Срок хранения открытого набора - 3 месяца.

11.4. 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
<b>Неправильная стандартная кривая.</b>	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.
<b>Низкая точность.</b>	Недостаточная промывка лунок планшета.	Выполняйте промывку в точном соответствии с инструкцией.
	Недостаточное смешивание и аспирация реагентов.	Обеспечьте адекватные 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.
<b>Низкие значения оптических плотностей.</b>	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.
<b>Неправильные значения.</b>	Неправильное хранение образцов.	Соблюдайте сроки и температуру хранения образцов, используйте свежие образцы.
	Неправильный сбор и подготовка образцов к анализу.	Четко следуйте указаниям инструкции по применению.
	Низкая концентрация хинолонов 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 хинолонов 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.