

**ИП2173 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЭНРОФЛОКСАЦИНА 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 энрофлоксацин в таких образцах, как ткани, мёд, молоко, сухое молоко, яйца и др.

В ходе реакции энрофлоксацин в образцах или стандартах конкурирует с энрофлоксацином на твёрдой фазе за центры связывания антител к энрофлоксацину. 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 энрофлоксацина. Концентрацию энрофлоксацина 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 и т.д.

Чувствительность: 0,1 мкг/кг.

Специфичность: данный набор отличается высокой специфичностью обнаружения энрофлоксацина. Перекрёстной реактивности или интерференции между энрофлоксацином и дру-

гими фторхинолонами не наблюдалось.

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 (84-96%);
- мёд (77-93%);
- молоко (71-95%);
- сухое молоко (76-98%);
- яйца (85-97%).

Количество тестов: 96.

4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированным энрофлоксацином.	1 шт.	-
2.	Высококонцентрированный стандарт (концентрация 100 мкг/кг).*	1 шт.	1 мл
3.	Стандартные растворы с концентрацией энрофлоксацина:*		
	- 0 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,1 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,3 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,9 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 2,7 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 8,1 мкг/кг.	1 шт.	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, весы, азотный испаритель с водяной баней, гомогенизатор, шейкер, вортекс, центрифуга, холодильник, высокоточные дозаторы (одно- и многоканальные) с переменным объемом дозирования, мерные цилиндры, пробирки, фильтровальная бумага.

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

6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

6.1. Отобрать необходимое количество стрипов планшета с сорбированным энрофлоксацином, 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 при-

бор 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 накопниками во избежание перекрёстной контаминации в ходе эксперимента.



7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

7.1. Приготовление 0,15 М раствора соляной кислоты.

Растворить 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. Полученный раствор может храниться при температуре 4 °С в течение 1 месяца.

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 комнатной 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 жидкости из верхнего органического слоя в чистую и сухую пробирку объёмом 10 мл и высушить при

помощи азотного испарителя с водяной баней при температуре 50-60 °С.

8.1.7. К сухому остатку добавить 1 мл н-гексана.

8.1.8. Перемешать на вортексе в течение 2 минут.

8.1.9. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.).

8.1.10. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

8.1.11. Удалить верхний слой н-гексана.

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

Примечание: фактор разведения образца - 2.

8.2. Подготовка мёда.

8.2.1. Гомогенизировать образец мёда.

8.2.2. Взвесить $1 \pm 0,05$ г гомогенизированного образца и поместить его в центрифужную пробирку.

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

8.2.4. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

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

8.2.6. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

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

8.2.8. Удалить надосадочную жидкость.

8.2.9. Взять 8 мл органического слоя в сухую пробирку и высушить при помощи азотного испарителя с водяной баней при температуре 50-60 °С.

8.2.10. К сухому остатку добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.) и 1 мл н-гексана.

8.2.11. Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.

8.2.12. Центрифугировать при 3000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

8.2.13. Удалить надосадочную жидкость.

8.2.14. Взять 50 мкл из нижнего слоя для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 2.

8.3. Подготовка молока.

8.3.1. Добавить 25 мкл молока в 475 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.).

8.3.2. Перемешать на вортексе в течение 1 минуты.

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 образца 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. Отобрать 100 мкл растворенного сухого молока и перенести его в 400 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.).

8.4.4. Перемешать на вортексе.

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 получения 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. Отобрать 100 мкл образца и перенести его в 400 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.3.). Тщательно перемешать.

8.5.5. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 30.

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 250 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 перевёрнутым 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_i - среднее значение оптической плотности каждого из стандартных растворов энрофлоксацина или исследуемого образца;

B_0 - 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 энрофлоксацина 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 энрофлоксацина в анализируемых образцах.

Концентрацию энрофлоксацина (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

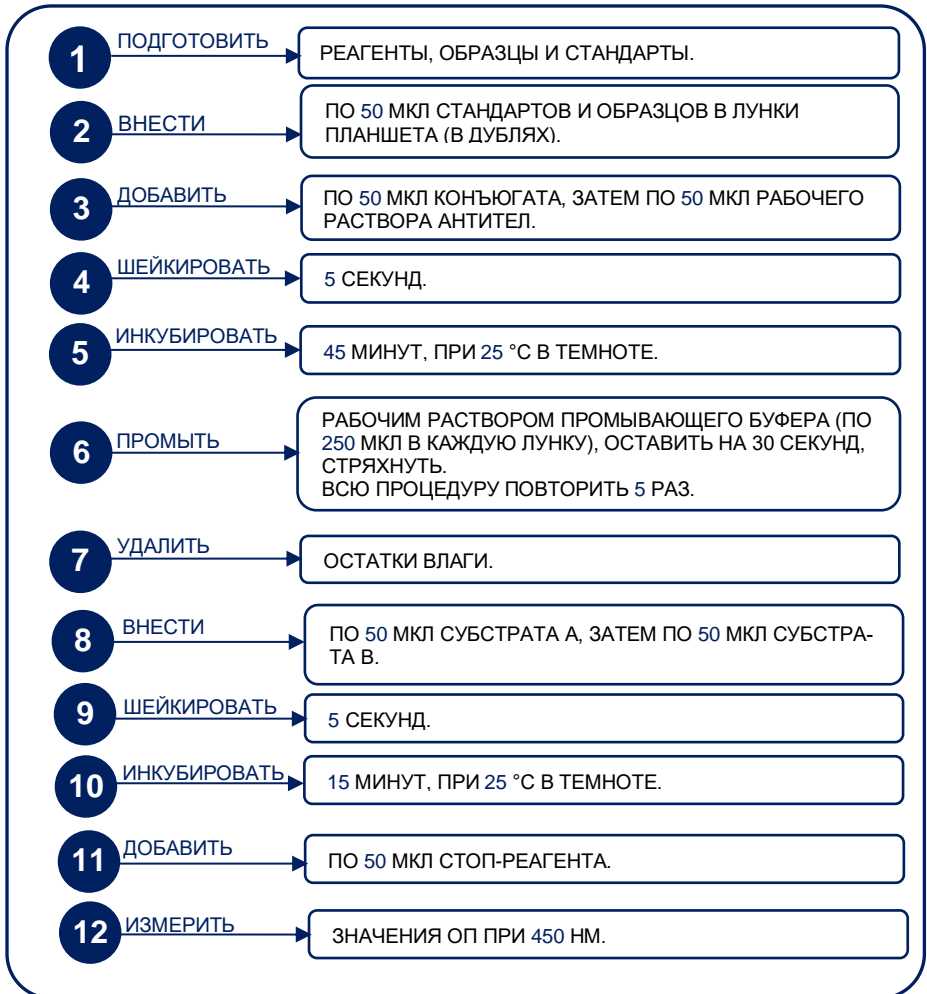
11.1. Невскрытые компоненты набора (за исключением планшета) хранить при температуре 2-8 °С в течение 1 года с даты изготовления. Избегать замораживания!

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
Неправильная стандартная кривая.	Неправильное построение стандартной кривой.	Обеспечьте точность при выполнении операций во время разведения.
	<p>Плохое качество выполнения процедуры промывки.</p> <p>Недостаточно тщательное удаление остатка влаги после процедуры промывки.</p>	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. 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.	Четко следуйте указаниям инструкции по применению.
	Низкая концентрация энрофлоксацина 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 энрофлоксацина 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.