

**ИП2519 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
СПЕКТИНОМИЦИНА 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.....	11
10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА .....	13
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ .....	15
12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА.....	16
13. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В РАБОТЕ НАБОРА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ. ....	17
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 спектиномицин в таких образцах, как ткани, мёд, молоко и т.д.

В ходе реакции спектиномицин в образцах или стандартах конкурирует со спектиномицином на твёрдой фазе за центры связывания антител к спектиномицину. 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 спектиномицина. Концентрацию спектиномицина 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 и т.д.

**Чувствительность:** 0,3 мкг/кг.

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

**Кросс-реактивность:**

- тилмикозин <0,1%;
- линкомицин <0,1%;
- неомицин <0,1%;
- стрептомицин <0,1%;
- гентамицин <0,1%;
- ампициллин <0,1%;
- канамицин <0,1%.

**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 - 74-108%;
- мёд - 81-95%;
- молоко - 70-94%.

**Количество тестов:** 96.

#### 4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированным спектиномицином.	1 шт.	-
2.	Стандартные растворы с концентрацией спектиномицина: <sup>*</sup> - 0 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 мл 1 мл 1 мл 1 мл 1 мл
3.	Конъюгат с пероксидазой хрена.	1 шт.	6 мл
4.	Рабочий раствор антител.	1 шт.	6 мл
5.	Субстрат А.	1 шт.	7 мл
6.	Субстрат В.	1 шт.	7 мл
7.	Стоп-реагент.	1 шт.	6 мл
8.	Промывающий буфер, 20-кратный концентрат.	1 шт.	30 мл
9.	Восстанавливающий буфер, 10-кратный концентрат.	1 шт.	20 мл
10.	Плётка для заклейки планшета.	4 шт.	-
11.	Трафарет.	1 шт.	-
12.	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, гомогенизатор, шейкер, вортекс, центрифуга, холодильник, высокоточные дозаторы (одно- и многоканальные) с переменным объёмом дозирования, мерные цилиндры, пробирки, фильтровальная бумага.

**Реагенты:** концентрированная соляная кислота, деионизированная или дистиллированная вода.

## 6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

6.1. Отобрать необходимое количество стрипов планшета с сорбированным спектиномицином, 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 наконечниками во избежание перекрёстной контаминации в ходе эксперимента.



## 7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

### 7.1. Приготовление 1 М раствора соляной кислоты.

Растворить 1 мл концентрированной соляной кислоты в 11 мл деионизированной или дистиллированной воды. Тщательно перемешать.

### 7.2. Приготовление рабочего раствора восстанавливающего буфера.

Разбавить восстанавливающий буфер 10-кратный концентрат деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:9 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. Разбавить промывающий буфер 20-



кратный концентрат деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:19 соответственно.

## **8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

### **8.1. Подготовка тканей.**

8.1.1. Измельчить образец до однородной массы (гомогената).

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

8.1.3. Добавить в пробирку 2 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.2.).

8.1.4. Перемешать на вортексе 2 минуты.

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

8.1.6. Взять 50 мкл надосадочной 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 пробирку.

8.2.3. Добавить в пробирку 2 мл деионизированной или дистиллированной воды.

8.2.4. Перемешать на вортексе 2 минуты.

8.2.5. Отобрать 100 мкл полученного раствора.

8.2.6. Добавить к нему 400 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.2.).

8.2.7. Перемешать на вортексе 30 секунд.

8.2.8. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 10.**

### **8.3. Подготовка молока.**

8.3.1. Взять 1 мл молока (без сливок) и поместить его в центрифужную пробирку.

8.3.2. Добавить в пробирку 50 мкл 1 М раствора соляной кислоты (п. 7.1.).

8.3.3. Перемешать на вортексе 1 минуту.

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

8.3.5. Отобрать 50 мкл надосадочной жидкости в другую пробирку.

8.3.6. Добавить в пробирку 450 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.2.).

8.3.7. Перемешать на вортексе 1 минуту.

8.3.8. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 10.**

## **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 10 секунд, затем инкубировать его в течение 20 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. 7.3.) и оставить на 15-30 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 накопечники.

### 9.6. Ферментативная реакция.

Смешать субстрат А с субстратом В в соотношении 1:1. Добавить по 100 мкл полученной смеси в каждую лунку. Заклеить планшет плёнкой. Инкубировать планшет в течение 10 минут при 25 °С **в темноте**.



- смесь субстрата А с субстратом В должна быть использована в течение 10 минут после смешивания;
- недопустимо смешивать субстраты в железной посуде.

**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 дли-

ны 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:

$$A = B_i / B_0 * 100, \text{ где}$$

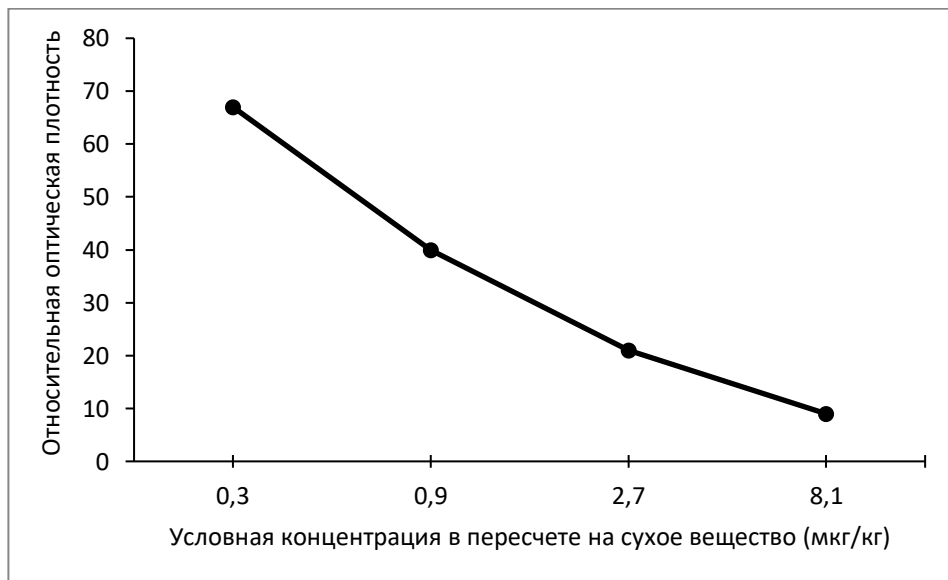
***A** - значение относительной оптической плотности, выраженное в процентах, от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения;*

***B<sub>i</sub>** - среднее значение оптической плотности каждого из стандартных растворов спектиномицина 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 спектиномицина в мкг/кг (0; 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 спектиномицина в анализируемых образцах.

Концентрацию спектиномицина ( $x$ ) 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
<b>Неправильная стандартная кривая.</b>	Неправильное построение стандартной кривой.	Проверьте соответствие значений для каждой точки стандартной кривой.
	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. 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 спектиномицина 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 спектиномицина 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.