

Общество с ограниченной ответственностью
Научно-производственное объединение «Иммунотэкс»

**Методика измерений массовой концентрации стрептомицина
в пищевой 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»)

Аттестат аккредитации на право аттестации методик (методов) измерений и проведения метрологической экспертизы документов № 01.00281-2013 от 03 декабря 2013 года.

Свидетельство об аттестации методики измерений

№ 004-01.00281-2013-2023 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@rostesm.ru

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

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ

Регистрационный код методики измерений по Федеральному реестр

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	7
4.3 Реактивы и растворы	7
4.4 Стандартные образцы	8
4.5 Тест-система для иммуноферментного анализа	8
5 Сущность метода	9
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды	9
7 Требования к квалификации оператора	10
8 Условия выполнения измерений	10
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 Подготовка растворов и реактивов	11
10.4 Подготовка образцов для испытаний (измерений)	11
11 Выполнение измерений	14
12 Обработка (вычисление) и оформление результатов измерений	15
12.1 Вычисление результатов измерений	16
12.2 Оформление результатов измерений	17
13 Контроль качества результатов измерений	18
14 Проверка приемлемости результатов, полученных в условиях воспроизводимости	19

1 Область применения

1.1 Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой концентрации стрептомицина в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы производства «ИммуноТэкс».

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

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).

Предел обнаружения остаточных количеств аминогликозидов (стрептомицина) в пищевой продукции методом иммуноферментного анализа составляет 0,05 мг/кг (мг/дм³).

1.4 Содержание аминогликозидов (стрептомицина) в продуктах животного происхождения регламентируется СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», а также 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 аминогликозидов (стрептомицина) не должно превышать 0,2 мг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем руководящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16 ГОСТ 25336-82. Посуда мерная лабораторная стеклянная.

17 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 стрептомицина 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, креветки	0,05 - 4,05	15	3,6	5,7	85%
Мясо, печень птицы	0,05 - 4,05	4	3,8	6,0	96%

1	2	3	4	5	6
Мясо, печень скота	0,05 - 4,05	4	5,2	8,3	96%
Яйца	0,05 - 4,05	22	2,4	3,8	80%
Сыр	0,05 - 4,05	20	4,9	7,8	80%
Масло сливочное	0,05 - 4,05	17	5,5	8,8	94%
Спреды	0,05 - 4,05	17	6,3	10,0	92%
Мед	0,05 - 4,05	15	4,2	6,7	85%
Молоко цельное, сухое молоко, молочные смеси	0,05 - 4,05	18	2,5	4,0	83%
Сливки	0,05 - 4,05	16	3,1	4,9	80%
Сметана	0,05 - 4,05	1	6,6	10,5	99%
Творог	0,05 - 4,05	32	6,3	10,0	83%

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) см ³ и (от 0,1 до 1) см ³ , 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) см ³ , 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.	ГОСТ OIML R 76-1-2011
4.1.5 Анализатор потенциометрический или pH-метр, погрешность измерений pH±0,01.	
4.1.6 Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные, вместимостью (25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000) см ³ .	ГОСТ 1770-74

4.1.7 Градуированные пипетки 2-го класса точности вместимостью (1, 2, 5, 10) см ³ .	ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81)
--	------------------------------

Примечание – Допускается использование других типов средств измерений, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведённых 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 Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (50±1) °С	
4.2.4 Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 37 °С с отклонением от заданной не более ±1 °С	ТУ 9452-002-00141798-97
4.2.5 Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
4.2.6 Измельчитель-гомогенизатор или фарфоровые ступки с пестиками	
4.2.7 Устройство для испарения экстрактов или роторный испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °С	
4.2.8 Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 16317-87
4.2.9 Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением до 4000 об/мин и возможностью охлаждения	
4.2.10 Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением до 20000 об/мин	
4.2.11 Шейкер лабораторный для пробирок типа «Вортекс»	
4.2.12 Принтер	
4.2.13 Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 — 2,0 см ³	
4.2.14 Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 см ³	
4.2.15 Пластиковые ванночки для реагентов	ГОСТ 25250-88
4.2.16 Перчатки медицинские одноразовые	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 (четвертичных аммониевых солей), спиртов, третичных аминов	ГОСТ Р 56990-2016
4.3.3 Н-гексан, ч	ТУ 2631-025-44493179-98
4.3.4 Натрия гидроокись (NaOH), хч	ГОСТ 4328-77

4.3.5 Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный (Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O), хч	ГОСТ 4172-76
4.3.6 Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный (NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O), хч	ГОСТ 245-76
4.3.7 Ортофосфорная кислота (H ₃ PO ₄)	ГОСТ 6552-80

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 стрептомицина ГСО 10309-2013 с массовой концентрацией: 1000000 нг/дм³ по 1,0 см³.

4.5 Тест- система для иммуноферментного анализа

4.5.1 Компоненты набора тест-системы

Набор для определения стрептомицина 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), сенсibiliзирoванных стрептомицином, в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Комплект градуировочных растворов стрептомицина массовыми концентрациями: 0, 100, 300, 900, 2700, 8100 нг/дм³ по 1,0 см³ - 6 шт.
3. Конъюгат антител с пероксидазой хрена, готовый к употреблению - 5,5 см³.
4. Рабочий раствор антител к стрептомицину - 5,5 см³.
5. Субстрат реагент А, содержит пероксид карбамида - 6 см³.
6. Субстрат реагент В, содержит тетраметилбензидин (ТМБ) - 6 см³.
7. Стоп-реагент, содержащий раствор 1н серной кислоты - 6 см³.
8. Буфер для восстановления образцов, 5-х кратный концентрат - 50 см³.
9. Промывающий буфер, приготовленный на основе одно- и двузамещенного фосфата натрия с добавлением твин-20, рН 7,4±0,5, 20-ти кратный концентрат - 40 см³.
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 анализа в 2-х повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

4.5.2 Характеристики набора Тест-системы

4.5.2.1 Чувствительность.

Минимальная концентрация стрептомицина, определяемая с помощью набора, составляет 0,05 мг/кг (дм³).

4.5.2.2 Степень извлечения - >80%.

4.5.2.3 Перекрестная реактивность:

Перекрестной реактивности с другими антибиотиками из группы аминогликозидов не наблюдалось.

5 Сущность метода

Измерение концентрации стрептомицина выполняют методом иммуноферментного анализа.

Планшет в наборе сорбирован стрептомицином.

Принцип метода основан на конкуренции в ходе реакции стрептомицина в образцах или стандартах со стрептомицином на твердой фазе за центры связывания с антителами к стрептомицину. В каждую лунку планшета добавляется конъюгат антител 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 стрептомицина. Концентрацию стрептомицина в образцах рассчитывают с помощью калибровочной кривой.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

6.1 Исследования с использованием 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 и проводиться работы с ними. 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 инструктажи 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) %;
- 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 стрептомицина 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 **чисто** специальными растворами, многократно промывают водопроводной водой, ополаскивают очищенной водой и высушивают в сушильном шкафу.

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

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 0,04М раствора ортофосфорной кислоты

1 см³ концентрированной ортофосфорной кислоты (H₃PO₄) разводят в мерной колбе объемом 500 см³ водой очищенной до объема 360 см³, тщательно перемешивают.

Приготовление 0,05М буферного раствора (PBS-буфер)

Навески 2,175 г натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного, 12,9 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного в объеме 800-900 см³ воды дистиллированной, доводят рН до 7,0 1М раствором гидроокиси натрия и доводят в мерной колбе объемом 1000 см³ водой очищенной до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление 1М раствора гидроокиси натрия

Навеску 40г гидроокиси натрия, разводят в мерной колбе объемом 1000 см³ водой очищенной до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление буферного раствора для восстановления образцов

Для приготовления готового к использованию буферного раствора для восстановления образцов одну часть 5-кратного концентрата растворяют в четырёх частях воды очищенной (например, смешивают 25 см³ концентрата и 100 см³ воды дистиллированной для приготовления 125 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 воды дистиллированной (например, смешивают 25 см³ концентрата и 475 см³ воды дистиллированной для приготовления 500 см³ раствора, готового к употреблению). Тщательно перемешивают. Готовый раствор может храниться при температуре 4 °С в течение 1 месяца.

10.4 Подготовка образцов для испытаний (измерений)

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

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 8 см³ 0,05М буферного раствора (PBS-буфер) и тщательно перемешивают на вортексе в течение 5 мин. После чего инкубируют на водяной бане в течение 30 мин при температуре (50-60) °С. 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, добавляют 1 см³ н-гексана, тщательно перемешивают на вортексе в течение 30 секунд.

Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 мин при температуре (20-25) °С.

4) Удаляют верхний органический слой н-гексана, берут 0,05 см³ жидкости из нижнего слоя, добавляют 0,45 см³ буферного раствора для восстановления образцов и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек. Растворяют сухой остаток в 1 см³ н-гексана, добавляют 0,5 см³ буфера для восстановления образцов,

5) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 40; минимально определяемая концентрация 0,05 мг/кг.

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

Подготовка образцов меда

1) Взвешивают 2 г меда в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 4 см³ 0,04М раствора ортофосфорной кислоты и тщательно перемешивают встряхиванием до полного растворения образца. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

2) К полученному раствору добавляют 0,45 см³ 1М раствора гидроксида натрия, доводя рН до 7,0-9,0. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 мин при температуре (20-25) °С.

3) Отбирают 0,05 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, добавляют 0,45 см³ буферного раствора для восстановления образцов и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек.

4) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 20; минимально определяемая концентрация 0,05 мг/кг.

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

Подготовка образцов молока, сливок

1) Центрифугируют образец при 4000 об/мин в течение 10 мин при 4°С. Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки.

2) Отбирают 2 см³ обезжиренного образца в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 8 см³ 0,05М буферного раствора (PBS-буфер) и тщательно перемешивают на вортексе в течение 5 мин. После чего инкубируют на водяной бане в течение 30 мин при температуре (50-60) °С. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С. При наличии дополнительно удаляют верхний липидный слой.

3) Отбирают 0,05 см³ жидкости из среднего осветлённого слоя, добавляют 0,45 см³ буферного раствора для восстановления образцов и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек.

4) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 50; минимально определяемая концентрация 0,05 мг/кг.

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

Подготовка образцов сухого молока, молочных смесей

1) Взвешивают 2г сухого образца в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 8 см³ 0,05М буферного раствора (PBS-буфер) и тщательно перемешивают на вортексе в течение 5 мин. После чего инкубируют на водяной бане в течение 30 мин при температуре (50-60) °С. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

2) Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки.

3) Отбирают 0,05 см³ жидкости из среднего осветленного слоя, добавляют 0,45 см³ буферного раствора для восстановления образцов и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек.

4) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения 50; минимально определяемая концентрация 0,05 мг/кг.

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

Подготовка образцов яиц

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

2) Взвешивают 1г гомогената в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 4 см³ 0,05М буферного раствора (PBS-буфер) и тщательно перемешивают на вортексе в течение 5 мин. После чего инкубируют на водяной бане в течение 30 мин при температуре (50-60) °С. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

3) Отбирают 0,5 см³ жидкости из среднего осветленного слоя, добавляют 0,5 см³ буферного раствора для восстановления образцов и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек.

4) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения 10; минимально определяемая концентрация 0,05 мг/кг.

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

Подготовка образцов молочных продуктов: творог, сметана, сыр, сливочное масло, спреды

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

2) Взвешивают 1г гомогената в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 4 см³ 0,05М буферного раствора (PBS-буфер) и тщательно перемешивают на вортексе в течение 5 мин. После чего инкубируют на водяной бане в течение 30 мин при температуре (50-60) °С до полного расплавления пробы. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С.

3) Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки.

4) Отбирают 0,5 см³ жидкости из среднего осветленного слоя, добавляют 0,5 см³ буферного раствора для восстановления образцов и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек.

5) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения 10; минимально определяемая концентрация 0,05 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ 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 непригоден.

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 испытаний 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 Испытания каждого исследуемого раствора экстрактов исследуемых образцов и градуировочных растворов выполняются в двукратной повторности.

Алгоритм проведения испытаний

При выполнении измерений массовой концентрации стрептомицина проводят следующие операции:

1. **Нумерация.** Вставляют в рамку планшета необходимое количество стрипов. Записывают положение лунок со стандартами и исследуемыми образцами на трафарете анализа. Градуировочные растворы и образцы рекомендуется раскапывать в дублях.

2. **Добавление образцов и антител:** добавляют по 0,05 см³ каждого градуировочного раствора массовой концентрации: (100, 300, 900, 2700, 8100) нг/дм³ и образцов в выбранные лунки, 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 25 °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 0,35 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 антител с пероксидазой хрена в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре 25 °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 25 °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 нулевым стандартом, значение которого принимается за 100 %.

Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,5 ($A_{450nm} < 0,5$), 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 параллельным микролункам 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 стрептомицина;

B_0 - среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

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

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

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

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

где:

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

x - массовая концентрация стрептомицина в экстракте испытуемой пробы, определяемая по градуировочному графику, 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 стрептомицина в различных пробах

Продукты животного происхождения	Фактор разведения
1	2
Ткани (рыба, креветки, печень, мясо)	40

1	2
Мёд	20
Молоко цельное, сухое, сливки, молочные смеси	50
Яйца	10
Творог, сметана, масло сливочное, спреды, сыр	10

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 испытаний (измерений) представляют в виде:

- *содержание стрептомицина в молоке < 0,05 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 анализируемых рабочих проб за месяц.

13.2 Оценка показателя повторяемости методики анализа

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

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

Повторяемость результатов параллельных измерений признают удовлетворительной, если:

$$r_k = X_{\max} - X_{\min} \leq r,$$

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 определений 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 стрептомицина в определяемых продуктах, мг/кг	Предел повторяемости (относительное значение допустимого расхождения между двумя параллельными результатами измерений), г, %
Рыба, креветки	0,05 - 4,05	13
Мясо, печень птицы	0,05 - 4,05	13
Мясо, печень скота	0,05 - 4,05	18
Яйца	0,05 - 4,05	8
Сыр	0,05 - 4,05	17
Масло сливочное	0,05 - 4,05	20
Спреды	0,05 - 4,05	22
Мед	0,05 - 4,05	15
Молоко цельное, сухое молоко, молочные смеси	0,05 - 4,05	9
Сливки	0,05 - 4,05	11
Сметана	0,05 - 4,05	24
Творог	0,05 - 4,05	22

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

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.

Значение предела 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 стрептомицина в определяемых продуктах, мг/кг	Предел воспроизводимости (допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений, полученных в разных лабораториях), R, %
1	2	3
Рыба, креветки	0,05 - 4,05	20
Мясо, печень птицы	0,05 - 4,05	21
Мясо, печень скота	0,05 - 4,05	30
Яйца	0,05 - 4,05	13

1	2	3
Сыр	0,05 - 4,05	28
Масло сливочное	0,05 - 4,05	32
Спреды	0,05 - 4,05	36
Мед	0,05 - 4,05	24
Молоко цельное, сухое молоко, молочные смеси	0,05 - 4,05	14
Сливки	0,05 - 4,05	17
Сметана	0,05 - 4,05	38
Творог	0,05 - 4,05	36

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.

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

Руководитель разработки и исполнитель:
Начальник научного отдела
ООО НПО «Иммунотэкс»,
кандидат биологических наук, доцент

А.А. Филь

МП

Утверждена:
Первым заместителем генерального директора
ФБУ «Ростовский ЦСМ»

№ 004-01.00281-2013-2023
от 01.02.2023 г.

В.А. Романов

Свидетельство об аттестации
методики измерений

Руководитель
предприятия-разработчика:
Директор ООО НПО «Иммунотэкс»

М.П.

М.В. Батурич