

**ИП2771 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СТРЕПТОМИЦИНА МЕТОДОМ ИФА**

ИНСТРУКЦИЯ

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



ОГЛАВЛЕНИЕ

1. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА.....	3
2. ПРИНЦИП ТЕСТА И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА.....	4
3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
4. СОСТАВ НАБОРА.....	7
5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ.....	8
6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ.....	8
7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ.....	9
8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	10
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	14
10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.....	16
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ.....	18
12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА.....	19
13. ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ В РАБОТЕ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ.....	20
14. ПРИМЕЧАНИЕ.....	22

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 стрептомицин в таких образцах, как ткани (рыба, креветки, печень и мясо птицы, печень и мясо скота), мёд, молоко цельное, сухое молоко, детские молочные смеси, сливки, творог, сметана, сыр, сливочное масло, спред, яйца. В ходе реакции стрептомицин в образцах или стандартах конкурирует со стрептомицином на твёрдой фазе за центры связывания антител к стрептомицину. 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 стрептомицина. Концентрацию стрептомицина 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 (рыба, креветки, печень и мясо птицы, печень и мясо скота), мёд, молоко цельное, сухое молоко, детские молочные смеси, сливки, творог, сметана, сыр, сливочное масло, спред, яйца.

Диапазон обнаружения:

- для образцов тканей (рыба, креветки, печень и мясо птицы, печень и мясо скота) 4-324 мкг/кг;
- для образцов мёда 2-162 мкг/кг;
- для образцов молока цельного, сухого молока, детских молочных смесей, сливок 5-405 мкг/кг;
- для образцов творога, сметаны, сыра, сливочного масла, спредов, яиц 1-81 мкг/кг.

Чувствительность:

- для образцов тканей (рыба, креветки, печень и мясо птицы, печень и мясо скота) 4 мкг/кг;
- для образцов мёда 2 мкг/кг;
- для образцов молока цельного, сухого молока, детских молочных смесей, сливок 5 мкг/кг;
- для образцов творога, сметаны, сыра, сливочного масла, спредов, яиц 1 мкг/кг.

Режим реакции: при 25 ± 1 °С, 30 минут - 30 минут - 15 минут.

Специфичность: данный набор отличается высокой специфичностью обнаружения стрептомицина. Перекрёстной реактивности или интерференции между стрептомицином и другими антибиотиками из группы аминогликозидов 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:

- рыба, креветки (85%);
- печень, мясо птицы (96%);
- печень, мясо скота (96%);
- яйца (80%);
- сыр (80%);
- масло сливочное (94%);
- спред (92%);
- мёд (85%);
- молоко цельное, сухое молоко, детские молочные смеси (83%);
- сливки (80%);
- сметана (99%);
- творог (83%).

Количество тестов: 96.

4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированным стрептомицином.	1 шт.	-
2.	Высококонцентрированный стандарт (концентрация 1 000 мкг/кг).*	1 шт.	1 мл
3.	Стандартные растворы с концентрацией стрептомицина:*		
	- 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.	11 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, гомогенизатор, шейкер, вортекс, центрифуга, водяная баня, холодильник, рН метр, высокоточные дозаторы (одно- и многоканальные) с переменным объёмом дозирования, мерные цилиндры, пробирки, фильтровальная бумага.

Реагенты: Н-гексан, натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), концентрированная фосфорная кислота (H_3PO_4), гидроксид натрия (NaOH), деионизированная или дистиллированная вода.



- 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 стрептомицином.



- 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 ± 1 °C).

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 0,05 М фосфатного буферного раствора.

Растворить 12,9 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 2,175 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл деионизированной или дистиллированной воды.

7.2. Приготовление 0,04 М раствора фосфорной кислоты.

Разбавить 1 мл концентрированной H_3PO_4 в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 360 мл.

7.3. Приготовление 1 М раствора гидроксида натрия.

Растворить 4 г NaOH в деионизированной или дистиллированной воде, доводя объём до 100 мл.

7.4. 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 2-8 °С в течение 1 месяца.

7.5. 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. Полученный раствор может храниться при температуре 2-8 °С в течение 1 недели.

8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

8.1. Подготовка тканей (рыбы, креветок, печени и мяса птицы, печени и мяса скота).

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 0,05 М фосфатного буферного раствора (п. 7.1.).

8.1.4. Перемешать на вортексе 5 минут.

8.1.5. Инкубировать в течение 30 минут на водяной бане при температуре 56 ± 1 °С.

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

8.1.7. Отобрать 1 мл надосадочной жидкости в чистую центрифужную пробирку.

8.1.8. Добавить к ней 1 мл Н-гексана.

8.1.9. Тщательно перемешать.

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

8.1.11. Удалить верхний органический слой.

8.1.12. Взять 50 мкл из нижнего слоя жидкости.

8.1.13. Добавить 450 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.4.).

8.1.14. Тщательно перемешать в течение 30 секунд.

8.1.15. Взять 50 мкл раствора для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 40.

8.2. Подготовка мёда.

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

8.2.2. Добавить в пробирку 4 мл 0,04 М раствора фосфорной кислоты (п. 7.2.). Тщательно перемешать до полного растворения.

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

8.2.4. Добавить 450 мкл 1 М раствора гидроксида натрия (п. 7.3.). Довести рН раствора до 7,0-9,0.

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

8.2.6. Взять 50 мкл надосадочной жидкости.

8.2.7. Добавить 450 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.4.).

8.2.8. Тщательно перемешать в течение 30 секунд.

8.2.9. Взять 50 мкл раствора для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 20.

8.3. Подготовка цельного молока, сухого молока, детских молочных смесей, сливок.

8.3.1. Центрифугировать образец при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре 4 ± 1 °С.

8.3.2. Удалить верхний слой жира.

8.3.3. Взять $2 \pm 0,05$ г образца и поместить его в центрифужную пробирку.

8.3.4. Добавить в пробирку 8 мл 0,05 М фосфатного буферного раствора (п. 7.1.).

8.3.5. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

8.3.6. Инкубировать в течение 30 минут на водяной бане при температуре 56 ± 1 °С.

8.3.7. Центрифугировать при числе об/мин больше 4000 в течение 10 минут при комнатной температуре.

8.3.8. Удалить верхний липидный слой.

8.3.9. Взять 50 мкл из среднего осветленного слоя жидкости.

8.3.10. Добавить 450 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.4.).

8.3.11. Тщательно перемешать в течение 30 секунд.

8.3.12. Взять 50 мкл раствора для проведения анализа.

Примечание: фактор разведения образца - 50.

8.4. Подготовка творога, сметаны, сыра, сливочного масла, спреда, яиц.

8.4.1. Измельчить образец до однородной массы (гомогената).

8.4.2. Взять $1 \pm 0,05$ г образца и поместить его в центрифужную пробирку.

8.4.3. Добавить в пробирку 4 мл 0,05 М фосфатного буферного раствора (п. 7.1.).

8.4.4. Перемешать на вортексе в течение 5 минут.

8.4.5. Инкубировать в течение 30 минут на водяной бане при температуре 56 ± 1 °С.

8.4.6. Центрифугировать при числе об/мин больше 4000 в течение 10 минут при комнатной температуре.

8.4.7. Удалить верхний липидный слой (при наличии).

8.4.8. Взять 500 мкл из среднего осветленного слоя жидкости.

8.4.9. Добавить 500 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.4.).

8.4.10. Тщательно перемешать в течение 30 секунд.

8.4.11. Взять 50 мкл 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 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 ± 1 °C **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. 7.5.) 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 ± 1 °C **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 ± 1 °C **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:

$$A = V_i / V_0 * 100, \text{ где}$$

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

V_i - среднее значение оптической плотности каждого из стандартных растворов стрептомицина 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 стрептомицина в мкг/кг (0; 0,1; 0,3; 0,9; 2,7; 8,1) построить калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат (например, рис. 1).

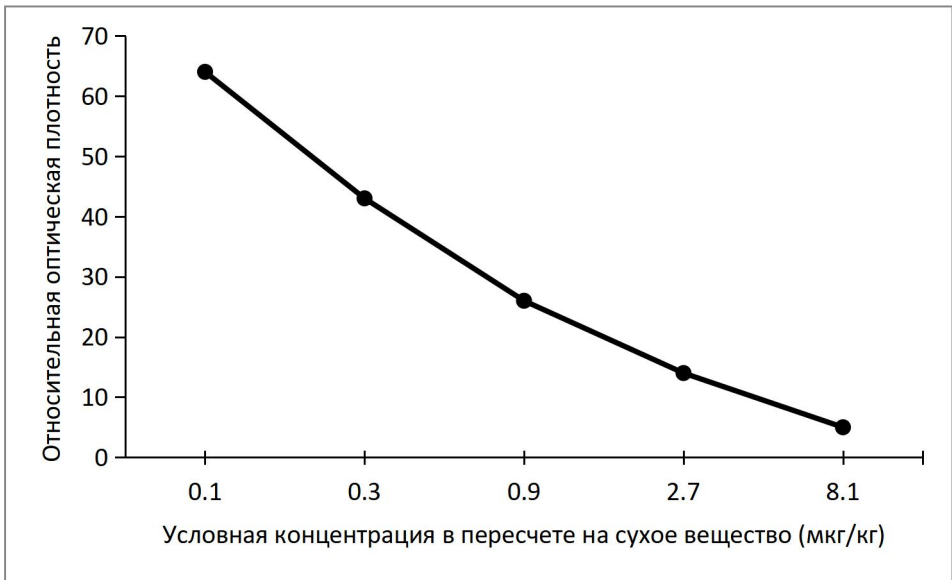


Рис. 1. Пример калибровочной кривой.

10.4. Нахождение концентрации стрептомицина в анализируемых образцах.

Концентрацию стрептомицина (x) в мкг/кг считать по

калибровочной кривой, после чего обязательно умножить её на фактор разведения (указан для каждого типа образцов при его подготовке).

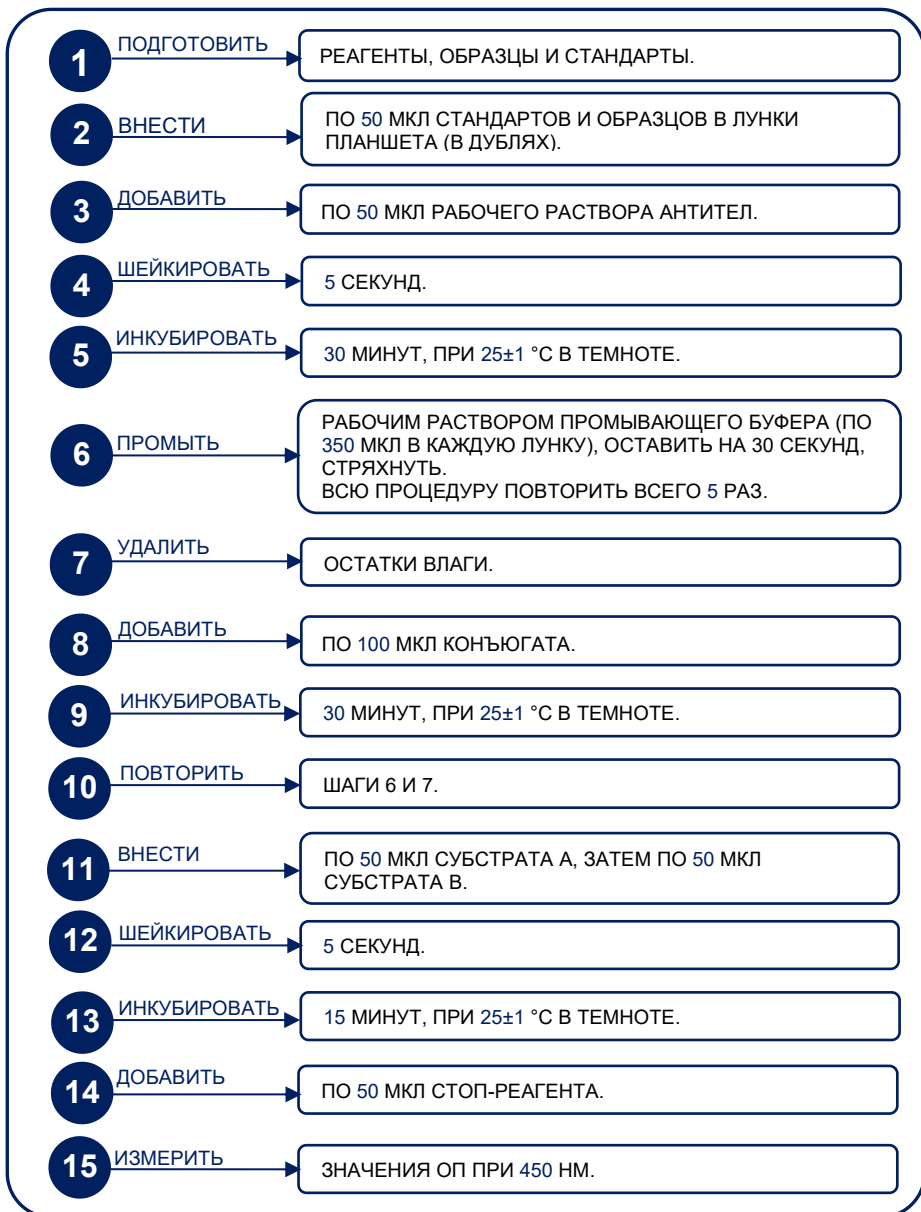
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

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

11.2. Открытый набор хранить при температуре 2-8 °С, защищая от света и влажности. Срок хранения открытого набора - 3 месяца.

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

12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА



Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

13. ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ В РАБОТЕ 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 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.
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 стрептомицина 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 24 °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 стрептомицина 0 мг/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.

