

**ИП2776 НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ХЛОРАМФЕНИКОЛА МЕТОДОМ ИФА**

**ИНСТРУКЦИЯ**

**МИ №029-01.00281-2013-2020 от 25.09.2020 г.**



## ОГЛАВЛЕНИЕ

1. РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ, УКАЗАННЫХ НА КОМПОНЕНТАХ НАБОРА.....	3
2. ПРИНЦИП ТЕСТА И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА.....	4
3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
4. СОСТАВ НАБОРА.....	8
5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ЕГО СОСТАВ.....	8
6. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ.....	9
7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ.....	10
8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	27
10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.....	29
11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ.....	31
12. КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА.....	32
13. ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ В РАБОТЕ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ.....	33
14. ПРИМЕЧАНИЕ.....	36

## 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 хлорамфеникол в таких образцах, как сыворотка крови свиньи, моча свиньи, кишечная оболочка, ткани (мясо скота, мясо птицы, рыба и креветки), печень, корм, мёд, яйца, молоко, сухое молоко, вода, йогурт (без наполнителя/с фруктами), кефир, пахта, молочная сыворотка, сливки, творог, сметана, масло сливочное, сыр.

В ходе реакции хлорамфеникол в образцах или стандартах конкурирует с хлорамфениколом на твёрдой фазе за центры связывания антител к хлорамфениколу. 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 хлорамфеникола. Концентрацию хлорамфеникола 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:** сыворотка крови свиньи, моча

свиньи, кишечная оболочка, ткани (мясо скота, мясо птицы, рыба и креветки), печень, корм, мёд, яйца, молоко, сухое молоко, вода, йогурт (без наполнителя/с фруктами), кефир, пахта, молочная сыворотка, сливки, творог, сметана, масло сливочное, сыр.

### **Диапазон обнаружения:**

- для образцов тканей (мяса скота, мяса птицы, рыбы и креветок), печени, мёда, молока, йогуртов (без наполнителя/с фруктами), кефира, пахты, молочной сыворотки, сливок 0,0125-1,0125 мкг/кг;

- для образцов сыворотки крови свиньи, мочи свиньи, кишечной оболочки 0,025-2,025 мкг/кг;

- для образцов сухого молока, кормов, творога, сметаны, сыров 0,025-2,025 мкг/кг;

- для образцов яиц, воды 0,05-4,05 мкг/кг;

- для образцов масла сливочного 0,13-10,53 мкг/кг.

### **Чувствительность:**

- для образцов тканей (мяса скота, мяса птицы, рыбы и креветок), печени, мёда, молока, йогуртов (без наполнителя/с фруктами), кефира, пахты, молочной сыворотки, сливок 0,0125 мкг/кг;

- для образцов сыворотки крови свиньи, мочи свиньи, кишечной оболочки 0,025 мкг/кг;

- для образцов сухого молока, кормов, творога, сметаны, сыров 0,025 мкг/кг;

- для образцов яиц, воды 0,05 мкг/кг;

- для образцов масла сливочного 0,13 мкг/кг.

**Режим реакции:** при  $25 \pm 1$  °С, 30 минут - 30 минут - 15 минут.

**Специфичность:** данный набор отличается высокой специфичностью обнаружения хлорамфеникола. Перекрестной реактивности или интерференции между хлорамфениколом и другими лекарственными препаратами 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 (85%);

- креветки (85%);
- печень, мясо скота (85%);
- мясо птицы (75%);
- яйца (90%);
- сыр (75%);
- масло сливочное (75%);
- мёд (85%);
- молоко (75%);
- сухое молоко (75%);
- сливки (75%);
- кефир (85%);
- йогурт (85%);
- пахта и молочная сыворотка (85%);
- сметана (75%);
- творог (75%);
- моча свиньи (70%);
- сыворотка крови свиньи (70%);
- кишечная оболочка (85%);
- корм (75%);
- вода (90%).

**Количество тестов: 96.**

#### 4. СОСТАВ НАБОРА

№ п/п	Наименование реагента	Количество	Объём
1.	96-луночный планшет с сорбированным хлорамфениколом.	1 шт.	-
2.	Высококонцентрированный стандарт (концентрация 100 мкг/кг).*	1 шт.	1 мл
3.	Стандартные растворы с концентрацией хлорамфеникола:*		
	- 0 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,025 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,075 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,225 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 0,675 мкг/кг;	1 шт.	1 мл
	- 2,025 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, 2-кратный концентрат.	1 шт.	50 мл
11.	Плётка для заклейки планшета.	4 шт.	-
12.	Зип-пакет (запасной).	1 шт.	-
13.	Трафарет.	1 шт.	-
14.	Инструкция.	1 шт.	-

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

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

**Оборудование и материалы:** микропланшетный ридер,

принтер, азотный испаритель, водяная баня, весы, гомогенизатор, шейкер, вортекс, центрифуга, микроцентрифуга, холодильник, высокоточные дозаторы (одно- и многоканальные) с переменным объемом дозирования, мерные цилиндры, пробирки, фильтровальная бумага.

**Реагенты:** натрия гидроокись ( $\text{NaOH}$ ), натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), натрий хлористый ( $\text{NaCl}$ ), натрий фосфорнокислый однозамещенный 12-водный ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), концентрированный метиловый спирт, этилацетат, Н-гексан, ацетонитрил,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , уксусная кислота,  $\beta$ -глюкуронидаза,  $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 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 хлорамфениколом.



- 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 ( $25 \pm 1$  °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 0,36 М раствора $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Тщательно растворить 10,7 г  $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  в 100 мл деионизированной или дистиллированной воды.

### 7.2. Приготовление 1,04 М раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Тщательно растворить 29,8 г  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 100 мл деионизированной или дистиллированной воды.

### 7.3. Приготовление 0,1 М раствора натрий-ацетатного буфера с $\text{pH}=4,8$ (для образцов мочи).

Растворить 2,4 г  $\text{CH}_3\text{COONa}$  в 500 мл деионизированной или дистиллированной воды, затем добавить 1,2 мл уксусной кислоты и тщательно перемешать.

#### 7.4. Приготовление водного раствора ацетонитрила.

Разбавить ацетонитрил деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 84:16 соответственно.

#### 7.5. Приготовление рабочего раствора восстанавливающего буфера.

Разбавить восстанавливающий буфер 2-кратный концентрат деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:1 соответственно. Полученный раствор может храниться при температуре 2-8 °С в течение 1 месяца.



- в случае, если наряду с другими типами образцов планируется анализ воды, следует **до приготовления рабочего раствора** отобрать нужное количество (см. п. 8.10.2.) 2-кратного концентрата.

#### 7.6. 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.

### **7.7. Приготовление 20М буферного раствора (PBS-буфера).**

Растворить 1,1 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 3,22 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  и 8,77 г  $\text{NaCl}$  в объеме 800-900 мл деионизированной или дистиллированной воды. Довести рН до 7,4 0,5н раствором  $\text{NaOH}$  (п. 7.8.). Довести общий объём в мерной колбе деионизированной или дистиллированной водой до 1000 мл. Тщательно перемешать.

### **7.8. Приготовление 0,5н раствора $\text{NaOH}$ .**

Тщательно растворить 20 г  $\text{NaOH}$  в 1000 мл деионизированной или дистиллированной воды.

### **7.9. Приготовление 10% раствора метилового спирта.**

Отобрать 10 мл концентрированного метилового спирта, довести объем раствора в мерной колбе до 100 мл деионизированной или дистиллированной водой. Тщательно перемешать.

### **7.10. Приготовление 20% раствора метилового спирта.**

Отобрать 20 мл концентрированного метилового спирта, довести объем раствора в мерной колбе до 100 мл деионизированной или дистиллированной водой. Тщательно перемешать.

## **8. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

### **8.1. Подготовка тканей (мяса скота, мяса птицы, рыб, креветок) и печени.**

8.1.1. Измельчить образец до однородной массы (гомогената).

8.1.2. Взвесить  $3 \pm 0,05$  г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.1.3. Добавить в пробирку 3 мл деионизированной или дистиллированной воды и тщательно перемешать на вортексе.

8.1.4. Добавить 6 мл этилацетата.

8.1.5. Перемешать на вортексе 2 минуты.

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

8.1.7. Отобрать 2 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.1.8. Растворить сухой остаток в 1 мл Н-гексана и добавить 0,5 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.). Тщательно перемешать в течение 30 секунд.

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

8.1.10. Удалить верхний органический слой.

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

**Примечание: фактор разведения образца - 0,5.**

## **8.2. Подготовка образцов сыворотки крови (свиньи).**

8.2.1. Взять 1 мл сыворотки крови и поместить её в центрифужную пробирку.

8.2.2. Добавить в пробирку 2 мл этилацетата.

8.2.3. Перемешать на вортексе 1 минуту.

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

8.2.5. Отобрать 1 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.2.6. Растворить сухой остаток в 1 мл Н-гексана и добавить 0,5 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.). Тщательно перемешать в течение 30 секунд.

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

8.2.8. Удалить верхний органический слой.

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

**Примечание: фактор разведения образца - 1.**

## **8.3. Подготовка образцов мочи (свиньи).**

8.3.1. Взять 2 мл мочи и поместить её в центрифужную пробирку. Добавить в пробирку 0,5 мл 0,1 М раствора натрий-ацетатного буфера с pH=4,8 (п. 7.3.) и все тщательно перемешать.

8.3.2. Добавить 40 мкл β-глюкуронидазы. Тщательно перемешать и гидролизовать при  $37\pm 1$  °С более 2 часов (либо оставить в таких условиях на ночь).

8.3.3. Довести полученный раствор до комнатной температуры.

8.3.4. Добавить 8 мл этилацетата.

8.3.5. Перемешать на вортексе 1 минуту.

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

8.3.7. Отобрать 4 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.3.8. Тщательно растворить сухой остаток в 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.3.9. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 1.**

## **8.4. Подготовка мёда.**

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

8.4.2. Добавить в пробирку 4 мл деионизированной или дистиллированной воды и растворить мёд.

8.4.3. Добавить 4 мл этилацетата.

8.4.4. Перемешать на вортексе 2 минуты.

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

8.4.6. Отобрать 2 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.4.7. Тщательно растворить сухой остаток в 0,5 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.4.8. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 0,5.**

## **8.5. Подготовка кишечной оболочки.**

8.5.1. Промыть кишечную оболочку и измельчить её до однородной массы (гомогената).

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

8.5.3. Добавить 10 мл этилацетата.

8.5.4. Перемешать на вортексе 2 минуты.

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

8.5.6. Отобрать 5 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.5.7. Растворить сухой остаток в 1 мл Н-гексана и добавить 0,5 рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.5.8. Перемешать на вортексе 30 секунд.

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

8.5.10. Удалить верхний органический слой.

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

**Примечание: фактор разведения образца - 1.**

## **8.6. Подготовка молока.**

8.6.1. Центрифугировать молоко при 4000 об/мин в течение 10 минут при  $15 \pm 1$  °С, удалить верхний жировой слой.

8.6.2. Взять 5 мл обезжиренного молока и поместить его в центрифужную пробирку.

8.6.3. Добавить 250 мкл 0,36 М раствора  $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (п. 7.1.).

8.6.4. Перемешать на вортексе 30 секунд.

8.6.5. Добавить 250 мкл 1,04 М раствора  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (п. 7.2.).

8.6.6. Перемешать на вортексе 30 секунд.

8.6.7. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре  $15 \pm 1$  °С.

8.6.8. Отобрать 2,2 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку.

8.6.9. Добавить 4 мл этилацетата.

8.6.10. Перемешать на вортексе 2 минуты.

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

8.6.12. Отобрать 2 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.6.13. Тщательно растворить сухой остаток в 0,5 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.6.14. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 0,5.**

## **8.7. Подготовка сухого молока.**

8.7.1. Взять  $2 \pm 0,05$  г сухого молока и поместить его в центрифужную пробирку.

8.7.2. Добавить 10 мл деионизированной или дистиллированной воды. Тщательно перемешать.

8.7.3. Добавить 1 мл 0,36 М раствора  $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (п. 7.1.) и 1 мл 1,04 М раствора  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (п. 7.2.)

8.7.4. Тщательно перемешать на вортексе.

8.7.5. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре  $15\pm 1$  °С.

8.7.6. Отобрать 3,6 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку.

8.7.7. Добавить 6 мл этилацетата.

8.7.8. Перемешать на вортексе 5 минут.

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

8.7.10. Отобрать 4 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.7.11. Тщательно растворить сухой остаток в 0,4 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.7.12. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 1.**

**8.8. Подготовка яиц.**

8.8.1. Перемешать яйца до однородной массы (гомогената).

8.8.2. Взвесить  $3 \pm 0,05$  г гомогената и поместить его в центрифужную пробирку.

8.8.3. Добавить 9 мл водного раствора ацетонитрила (п. 7.4.)

8.8.4. Перемешать на вортексе 2 минуты.

8.8.5. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре  $15 \pm 1$  °С.

8.8.6. Отобрать 3 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку.

8.8.7. Добавить 3 мл деионизированной или дистиллированной воды.

8.8.8. Добавить 4,5 мл этилацетата.

8.8.9. Перемешать на вортексе 1 минуту.

8.8.10. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре  $15 \pm 1$  °С.

8.8.11. Отобрать всю надосадочную жидкость в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

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

8.8.13. Добавить 2 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.8.14. Перемешать на вортексе 30 секунд.

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

8.8.16. Удалить верхний органический слой.

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

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

### **8.9. Подготовка корма.**

8.9.1. Измельчить корм до однородной массы (гомогената).

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

8.9.3. Добавить 2 мл деионизированной или дистиллированной воды.

8.9.4. Добавить 6 мл этилацетата.

8.9.5. Перемешать на вортексе 2 минуты.

8.9.6. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре  $15 \pm 1$  °С.

8.9.7. Отобрать 3 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

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

8.9.9. Добавить 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.9.10. Перемешать на вортексе 30 секунд.

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

8.9.12. Удалить верхний органический слой.

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

**Примечание: фактор разведения образца - 1.**

### **8.10. Подготовка воды.**

8.10.1. Перелить 0,5 мл воды в центрифужную пробирку.

8.10.2. Добавить 0,5 мл восстанавливающего буфера (**2-кратного концентрата!**).

8.10.3. Перемешать на вортексе 1 минуту.

8.10.4. Взять 50 мкл раствора для проведения анализа.

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

**8.11. Подготовка йогурта (без наполнителя/с фруктами), кефира, пахты, молочной сыворотки и сливок.**

8.11.1. При наличии в образце частиц твёрдой консистенции, отбросить их, отобрав жидкую фракцию.

8.11.2. Нейтрализовать образец до pH  $7,0 \pm 0,5$  с помощью 0,5 н раствора NaOH (п. 7.8.).

8.11.3. Взять  $10 \pm 0,05$  г образца, добавить 8 мл 20М буферного раствора (PBS-буфера) (п. 7.7.), тщательно перемешать на вортексе.

8.11.4. Добавить 1 мл 0,36 М раствора  $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (п. 7.1.). Перемешать на вортексе 30 секунд.

8.11.5. Добавить 1 мл 1,04 М раствора  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (п. 7.2.).

8.11.6. Перемешать на вортексе 30 секунд.

8.11.7. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре  $4\pm 1$  °С.

8.11.8. Отобрать 4 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку.

8.11.9. Добавить 8 мл этилацетата.

8.11.10. Перемешать на вортексе 2 минуты.

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

8.11.12. Отобрать 4 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.11.13. Тщательно растворить сухой остаток в 1 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.11.14. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 0,5.**

**8.12. Подготовка творога и сметаны.**

- 8.12.1. Взвесить  $5 \pm 0,05$  г образца и поместить его в центрифужную пробирку.
- 8.12.2. Добавить 15 мл 10% раствора метилового спирта (п. 7.9.)
- 8.12.3. Перемешать на вортексе в течение 1 минуты.
- 8.12.4. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 15 минут при температуре  $4 \pm 1$  °С.
- 8.12.5. Удалить верхний слой жира.
- 8.12.6. Отобрать 4 мл обезжиренной средней части в другую центрифужную пробирку.
- 8.12.7. Добавить 8 мл этилацетата.
- 8.12.8. Перемешать на вортексе 10 минут.
- 8.12.9. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре.
- 8.12.10. Отобрать 4 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.
- 8.12.11. Растворить сухой остаток в 0,5 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).
- 8.12.12. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 1.**

### **8.13. Подготовка масла сливочного.**

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

8.13.2. Добавить 2 мл Н-гексана

8.13.3. Перемешать на вортексе в течение 10-15 секунд.

8.13.4. Добавить 1 мл 20% раствора метилового спирта (п. 7.10.)

8.13.5. Перемешать на вортексе в течение 10 минут.

8.13.6. Центрифугировать при 3000 об/мин в течение 10 минут при температуре  $4 \pm 1$  °С.

8.13.7. Удалить верхний слой жира.

8.13.8. Отобрать 0,7 мл обезжиренной средней части в другую микроцентрифужную пробирку.

8.13.9. Поместить пробирку на лёд на 10 минут.

8.13.10. Центрифугировать при 20000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре.

8.13.11. Отобрать нижнюю водную фазу.

8.13.12. Развести рабочим раствором восстанавливающего буфера (п. 7.5.). в соотношении 1:3,5 (например: 200 мкл нижней фазы + 700 мкл рабочего раствора восстанавливающего буфера).

8.13.13. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 5,2.**

## **8.14. Подготовка сыра.**

8.14.1. Удалить с поверхности сыра плесневый налет (при наличии).

8.14.2. Измельчить образец до однородной массы (гомогената).

8.14.3. Взвесить  $10 \pm 0,05$  г образца и поместить его в центрифужную пробирку.

8.14.4. Добавить 30 мл 10% раствора метилового спирта (п. 7.9.).

8.14.5. Перемешать на вортексе в течение 1 минуты.

8.14.6. Инкубировать на водяной бане при температуре  $(40 \pm 1)$  °С в течение 10 минут, встряхивая минимум 3 раза в течение инкубации.

8.14.7. Центрифугировать при 4000 об/мин в течение 15 минут при температуре  $4 \pm 1$  °С.

8.14.8. Удалить верхний слой жира.

8.14.9. Отобрать 3,5 мл обезжиренной нижней части в другую центрифужную пробирку.

8.14.10. Добавить 7 мл этилацетата.

8.14.11. Перемешать на вортексе 10 минут.

8.14.12. Центрифугировать при 3000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре.

8.14.13. Отобрать 3,5 мл надосадочной жидкости в другую центрифужную пробирку и высушить её при 50-60 °С с помощью азотного испарителя.

8.14.14. Растворить сухой остаток в 0,5 мл рабочего раствора восстанавливающего буфера (п. 7.5.).

8.14.15. Взять 50 мкл полученного раствора для проведения анализа.

**Примечание: фактор разведения образца - 1.**

## **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  $25 \pm 1$  °С **в темноте**.

9.3. Осторожно снять плёнку. Удалить жидкость из лунок планшета путём стряхивания.

#### 9.4. Промывка.

**Немедленно** добавить во все лунки планшета по 350 мкл рабочего раствора промывающего буфера (п. 7.6.) 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. Добавление конъюгата.

Добавить 100 мкл конъюгата с пероксидазой хрена в каждую лунку. Заклеить планшет плёнкой. Инкубировать планшет в течение 30 минут при  $25 \pm 1$  °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  $25 \pm 1$  °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:

$$A = B_i / B_0 * 100, \text{ где}$$

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

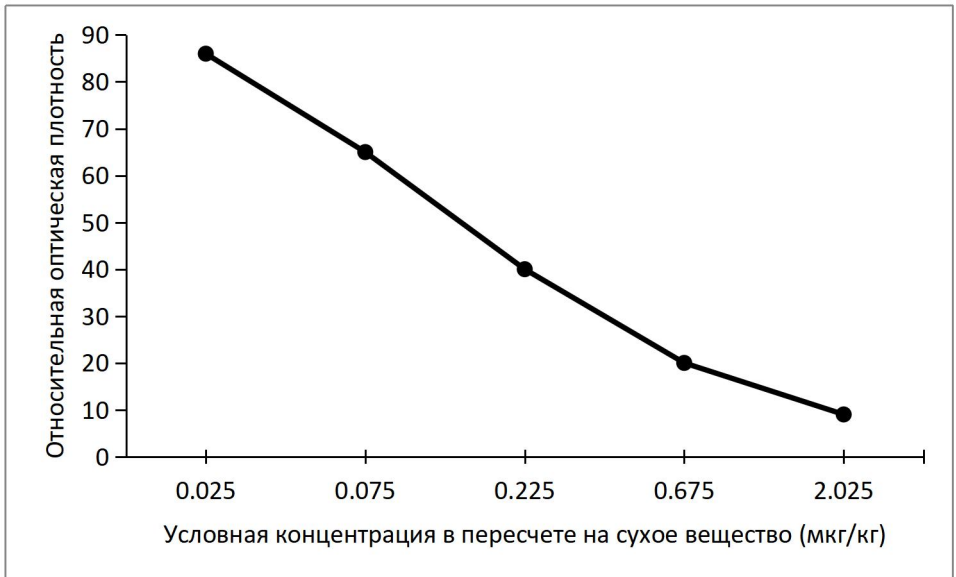
*B<sub>i</sub>* - среднее значение оптической плотности каждого из

стандартных растворов хлорамфеникола 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 хлорамфеникола в мкг/кг (0; 0,025; 0,075; 0,225; 0,675; 2,025) построить калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат (например, рис. 1).



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

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

Концентрацию хлорамфеникола (х) в мкг/кг считать по калибровочной кривой, после чего обязательно умножить её на фактор разведения (указан для каждого типа образцов при его подготовке).

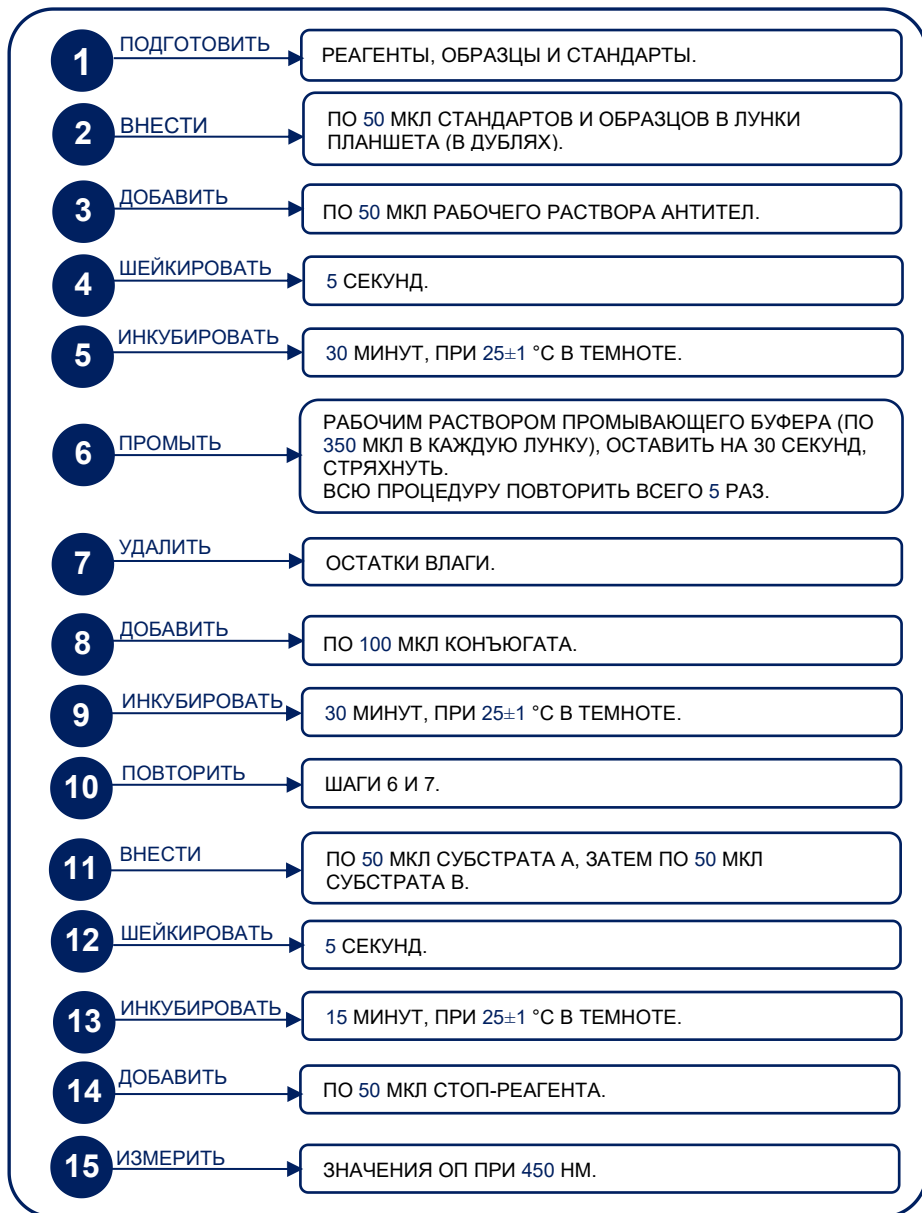
### **11. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ**

11.1. Невскрытые компоненты набора 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
<b>Неправильная стандартная кривая.</b>	Неправильное построение стандартной кривой.	Обеспечьте точность при выполнении операций во время разведения.
	Плохое качество выполнения процедуры промывки. Недостаточно тщательное удаление остатка влаги после процедуры промывки.	Выполняйте процессы промывки и аспирации лунок в точном соответствии с инструкцией.
	Погрешности в дозировании.	Используйте в работе дозаторы, прошедшие периодическую поверку. Проведите калибровку дозаторов.
<b>Низкая точность.</b>	Недостаточная промывка лунок планшета.	Выполняйте промывку в точном соответствии с инструкцией.
	Недостаточное смешивание и аспирация реагентов.	Обеспечьте адекватные смешивание и аспирацию реагентов.
	Повторное использование наконечников для дозаторов, ёмкостей для реагентов и плёнок для заклейки планшетов.	Используйте наконечники, ёмкости для реагентов и плёнки для заклейки планшетов однократно.

	Погрешности в дозировании.	Используйте в работе дозаторы, прошедшие периодическую поверку. 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 хлорамфеникола 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 хлорамфеникола 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.