



МУЛЬТИСКРИН® Охратоксин А

Набор реагентов для определения охратоксина А в пищевой продукции и кормах методом иммуноферментного анализа

Версия 2.0

РАЗРАБОТАНО
ОДО «КомПродСервис»
в научно-техническом сотрудничестве с
Институтом биоорганической химии
НАН Беларуси

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, по вопросам технической поддержки и дополнительной информации обращайтесь к производителю или официальному дистрибьютору на территории Вашей страны:



Производитель:
ОДО "КомПродСервис"
ул. Филимонова, 25Г, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

Техническая поддержка
support@komprod.com
+375 17 336 50 54

Официальный дистрибьютор в России:
ООО "НеоТест"

ул. Раstopчина, 1Г, г. Владимир
+7 499 649 02 01
info@neo-test.ru
www.neo-test.ru

Техническая поддержка
support@neo-test.ru
+7 499 704 05 50



МУЛЬТИСКРИН® Охратоксин А

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Набор реагентов МУЛЬТИСКРИН® Охратоксин А предназначен для количественного определения содержания охратоксина А (ОТА) в зерне, зернобобовых и масличных культурах, продуктах их переработки: мукомольно-крупяных, макаронных и хлебобулочных изделиях, продукции масложировой промышленности, кормовой продукции пивоваренной и крахмалопаточной промышленности, спиртового производства, вине, виноградном соке, изюме, пиве, кофе, а также в кормах и комбикормах, в зеленых, сочных и грубых кормах в целях ветеринарно-санитарной экспертизы и санитарно-гигиенического контроля методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа.

1.2 Наличие микотоксинов в кормах, продовольственном сырье и продуктах питания вызывает ряд необратимых патологических изменений в организме, представляя серьезную угрозу для здоровья человека и животных, и приносит большой экономический ущерб в сельском хозяйстве. Во многих странах мира существует обязательная система контроля кормов, пищевого сырья и продуктов питания растительного происхождения на наличие и содержание основных микотоксинов. В странах ЕС это отражено в ряде Регламентов и Директив ЕС, таких как 2002/32/ЕС, ЕЕС №1881/ 2006, 2006/576/ЕС и т.д. В Республике Беларусь эти мероприятия регулируются санитарными нормами и правилами «Требования к продовольственному сырью и пищевым продуктам», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.13г. №52, и гигиеническим нормативом «Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.13г. №52, ТР ТС 021 «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна» и ветеринарно-санитарными правилами обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов, утвержденными Постановлением Минсельхозпрода РБ от 10.02.2011 № 10 в редакции №33 от 20.05.2011.

1.3 Набор рассчитан на проведение анализа 43 исследуемых проб и 5 градуировочных растворов в дубликатах или 91 исследуемой пробы и 5 градуировочных растворов при проведении единичных измерений, всего 96 определений. При необходимости набор может быть разделен на 3-4 независимые части с различным количеством определяемых проб. Для каждой постановки необходимо построение нового градуировочного графика.

Предел измерений ОТА определяется нижним значением величины диапазона измерений. Диапазон измерения (1,5-40,0) мкг/кг. Диапазон измерения для кормов и продукции комбикормовой промышленности; зеленых, сочных и грубых кормов (2,0 – 40,0) мкг/кг. Продолжительность анализа составляет 30-40 мин без учета пробоподготовки.

2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 В состав набора входят следующие компоненты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Состав набора

Компонент	Количество
1 Иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
2 Планшет для смешивания	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
3 Градуировочные растворы С ₀ , С ₁ , С ₂ , С ₃ , и С ₄ с условными значениями концентрации ОТА 0; 1,0; 3,0; 10,0 и 40,0 мкг/кг, готовы к использованию	5 флаконов по 0,7 мл
4 Конъюгат, 11-кратный концентрат	1 пробирка, 1,4 мл
5 Раствор для разведения конъюгата	1 флакон, 14 мл
6 Промывочный раствор, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл
7 Хромоген-субстратный раствор, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
8 Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл

Примечания

1. Для удобства расчетов результатов анализа сделан перевод истинных концентраций ОТА в градуировочных растворах в массовые доли (мкг/кг) ОТА в образцах путем умножения на коэффициент 5, учитывающий фактор разведения при подготовке пробы из исследуемого сухого образца продукции. Это позволяет находить значение массовой доли ОТА в образце непосредственно по градуировочному графику. Однако, фактор разбавления F, равный 0,58, необходимо учитывать в случае анализа вина и пива.

2. В состав набора вместо хромоген-субстратного раствора могут быть включены раствор хромогена ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин), 1 флакон, 0,7 мл, и субстратный буферный раствор, 1 флакон, 14 мл.

2.2 Принцип работы набора. В наборе МУЛЬТИСКРИН® Охратоксин А использован метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее – ИФА). Охратоксин А экстрагируют из размолотого образца раствором метанол:вода = 70:30. В лунки планшета для предварительного смешивания вносят рабочий раствор конъюгата охратоксина с пероксидазой из корней хрена, добавляют градуировочные растворы с известной концентрацией ОТА или подготовленные к анализу растворы проб и аликвоты полученной смеси переносят в лунки иммуносорбента. Во время последующей инкубации ОТА в составе градуировочного раствора или анализируемой пробы конкурируют с конъюгатом за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок иммуносорбента.

После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами микотоксины, добавляют хромоген-субстратный раствор, который под действием фермента в составе связанного с антителами конъюгата превращается в окрашенный продукт. Интенсивность окраски обратно пропорциональна содержанию ОТА в анализируемом образце или градуировочном растворе. Затем добавляют стоп-реагент, останавливающий ферментативную реакцию и одновременно изменяющий окраску раствора с голубой на желтую. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на многоканальном планшетном фотометре как величину оптической плотности, выраженную в оптических единицах (о.е.), при длине волны 450 нм. На основании значений оптической плотности компьютерная программа строит градуировочный график и автоматически рассчитывает массовую долю ОТА в исследуемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

3.2 Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с анализируемыми образцами, экстрактами и градуировочными растворами, так как они содержат охратоксин А, обладающий канцерогенным, нефро- и гепатотоксичным действием.

Метанол, входящий в состав экстрагирующего раствора и градуировочных растворов, является сильным ядом. Не допускайте его контактов с кожей и глазами. В случае попадания на тело немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды.

Стоп-реагент содержит разбавленную серную кислоту, которая обладает раздражающим действием. В случае попадания на кожу и слизистые оболочки пораженный участок следует немедленно промыть большим количеством проточной воды.

3.3 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 При работе следует надевать халат и одноразовые пластиковые или резиновые перчатки.

3.5 Химическая посуда и оборудование, которые используют при работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

3.6 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Реагенты набора, экстракты проб, градуировочные и другие растворы, используемые в анализе, необходимо отбирать отдельными кончиком пипетки.

4.2 Не допускается использование набора после окончания срока годности.

4.3 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из разных серий данного набора или отдельные компоненты из наборов других изготовителей.

4.4 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость. Вся используемая для приготовления реагентов стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта хромовой смесью, многократно промыта водопроводной водой и сполоснута дистиллированной водой.

4.5 Необходимо обратить внимание на тщательное, но аккуратное перемешивание содержимого каждого компонента, а также растворов в лунках планшета для смешивания. Во всех случаях следует избегать образования пены.

4.6 Если проведение ИФА начато, то все последовательные стадии следует выполнять, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени и выдерживая установленную продолжительность инкубации. Следует исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

4.7 Во время проведения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности или держать компоненты на ярком свете во время инкубации или хранения.

4.8 Поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор перед использованием должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

4.9 Необходимо использовать микропланшетный фотометр и дозаторы пипеточные переменного объема, поверенные государственной метрологической службой.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 При работе с набором следует использовать следующие средства измерений, оборудование и материалы.

Автоматический микропланшетный фотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, с пределом допускаемой погрешности измерения оптической плотности не более 5 %.

Весы лабораторные среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 400 г и погрешностью взвешивания не более 0,1 г.

Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 220 г и погрешностью взвешивания не более 0,1 мг.

Восьмиканальный дозатор переменного объема (30-300) мкл с погрешностью дозирования не более 3 % со сменными одноразовыми наконечниками.

Одноканальные дозаторы переменного объема: (5-50) мкл с погрешностью дозирования не более 3 %, (20-200) мкл с погрешностью дозирования не более 1,5 %, (100-1000) мкл с погрешностью дозирования не более 1,5% со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

Водяная баня, обеспечивающая температуру нагрева (37-40) °С.

Лабораторный встряхиватель, диапазон регулирования скорости (0-300) об/мин.

Мельница типа «Циклон» (Cyclotec Tecator, Швеция; ЛМТ-1, Россия и др.), снабженная металлическими ситами с отверстиями диаметром 1 мм, обеспечивающая 100 %-ный проход частиц через указанные сита.

Мельница типа МЛЗ или других аналогичных марок по ТНПА, обеспечивающая требуемую крупность размола.

Сита лабораторные для мукомольной промышленности с номинальным размером круглого отверстия в свету или квадратного отверстия сетки 1 мм.

Гомогенизатор или бытовой блендер.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g.

Секундомер или таймер.

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры (20-25) °С.

Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру (2-8) °С в холодильной камере, и температуру не выше минус 18 °С в морозильной камере.

Воронки стеклянные.

Колбы конические вместимостью 100 мл.

Стаканы вместимостью 100 и 500 мл.

Цилиндры вместимостью 50, 100 и 500 мл.

Пробирки стеклянные с пробкой вместимостью 15 мл.

Пробирки полипропиленовые центрифужные с крышкой (типа Фалкон) вместимостью 15 и 50 мл.

Стеклянные или пластмассовые флаконы с завинчивающейся крышкой вместимостью 20 мл.

Фильтры обеззоленные «белая лента».

Бумага индикаторная универсальная.

Стеклянные или полиэтиленовые емкости с плотно закрывающимися крышками.

Пленка «парафильм», клейкая лента или крышка для микротитровального планшета.

Чашки Петри стеклянные многоразовые диаметр 100 мм, высота 15 мм или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки.

Штатив для пробирок.

Перчатки резиновые или пластиковые.

5.2 Реактивы, используемые в работе.

Вода дистиллированная или деионизованная.

Кислота соляная х.ч. (плотность 1,19 г/мл, массовая доля HCl 38,3 %).

Кислота ортофосфорная х.ч. (массовая доля H₃PO₄ 87 %)

Метанол ч.д.а.

Натрия гидроокись х.ч.

Натрий углекислый х.ч.

Натрий углекислый кислый х.ч.

Метилен хлористый х.ч.

Примечание – Допускается применение другого оборудования и реактивов, не уступающих по своим свойствам и качеству приведенным выше.

6 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

6.1 Приготовление 20 %-го раствора натрия гидроокиси

Взвешивают ($10,0 \pm 0,1$) г натрия гидроокиси в стакане вместимостью 100 мл и растворяют в 40 мл дистиллированной воды. После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в полиэтиленовую емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения при температуре (20 ± 5) °С – 1 мес.

6.2 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=70:30

В стакан вместимостью 500 мл цилиндром приливают 350 мл метанола и 150 мл дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 5) °С – 3 мес.

6.3 Приготовление 0,05 М карбонат-бикарбонатного буфера рН 9,6-9,8

Взвешивают 0,16 г натрия углекислого и 0,30 г натрия углекислого кислого, переносят в стакан вместимостью 200 мл и растворяют в 100 мл дистиллированной воды при перемешивании. Раствор переносят в стеклянную емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения при температуре (4-8) °С – 1 нед.

6.4 Приготовление 35 %-го раствора ортофосфорной кислоты

В стакан вместимостью 50 мл цилиндром приливают 30 мл дистиллированной воды и аккуратно приливают 20 мл ортофосфорной кислоты, полученный раствор перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 5) °С – 3 мес.

6.5 Приготовление рабочего промывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора интенсивно встряхивают в течение 10-20 с, в случае образования кристаллов помещают флакон на водяную баню при температуре 37°С и выдерживают до полного растворения кристаллов.

Рабочий промывочный раствор готовят в стакане вместимостью 500 мл, разбавляя концентрат промывочного раствора дистиллированной водой в соотношении 1:9 (например, 10 мл – концентрата, 90 мл – воды). Раствор интенсивно перемешивают, не допуская образования пены.

Раствор переносят в емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (2-8) °С -1 мес.

6.6 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочий раствор конъюгата готовят в пробирке или флаконе, разбавляя концентрат конъюгата раствором для разведения конъюгата в 11 раз (соотношение по объему 1:10, например, 100 мкл – концентрат конъюгата, 1000 мкл – раствор для разведения), из расчета 100 мкл рабочего раствора конъюгата на каждую лунку. Для этого в чистую пробирку или флакон вносят необходимое количество раствора для разведения конъюгата, добавляют в 10 раз меньшее количество концентрата конъюгата и перемешивают круговыми движениями, не допуская образования пены.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

6.7 Приготовление хромоген-субстратного раствора (если потребуется).

Хромоген-субстратную смесь готовят в темных стеклянных или пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Раствор хромогена разводят субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1:20, например: 100 мкл – хромогена, 2000 мкл – буферного раствора) из расчета 100 мкл на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 мл вносят необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляют в 20 раз меньшее количество раствора хромогена и интенсивно перемешивают в течение (30-40) с.

Примечание – Субстратный буферный раствор и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.

Приготовленный или поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

7 ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

7.1 Отбор проб проводят по СТБ 1036, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 27668, ГОСТ ISO 6497, и другим ТНПА на конкретные виды продукции.

Отобранные проб могут храниться в защищенном от света месте при температуре (2-25) °С в течение 30 суток без доступа влаги. Допускается хранение при температуре минус 18 °С в течение 6 месяцев в условиях исключаяющих изменение их влажности. Перед проведением подготовки проб замороженные образцы должны быть разморожены при температуре (2 -8) °С.

7.2 Подготовка проб зерновых, зернобобовых, масличных культур и продуктов их переработки, кормов.

Доводят температуру проб, отобранных в соответствии с п. 7.1, до значений 20-25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды.

Пробы зерна, зернобобовых, масличных, макаронных, крупяных изделий, продуктов переработки зерновых (отруби, жмыхи, шроты), кормов размалывают на мельнице типа «Циклон». При отсутствии мельницы такого типа пробу размалывают на лабораторной мельнице МЛЗ или мельнице других аналогичных марок, не снабженных ситами. Затем просеивают через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм. Остаток на сите снова измельчают на мельнице марки МЛЗ так, чтобы он весь прошел через сито с отверстиями диаметром 1 мм, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Пробы хлебобулочных изделий, кормовых продуктов пивоваренной промышленности и спиртового производства, мезги измельчают с помощью гомогенизатора или бытового блендера, перемешивают. Пробы мукомольных изделий, глютен – тщательно перемешивают

Навеску исследуемой пробы массой (5,0±0,1) г помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и цилиндром добавляют 25 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода=70:30. Важно соблюдать

соотношение масса пробы : объем экстрагирующей смеси = 1:5. Коническую колбу закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на встряхивателе при 150 об/мин в течение 5-7 мин. Затем раствор выдерживают в течение 5-10 мин для осаждения частиц пробы и быстро фильтруют от 10 до 15 мл верхнего слоя в стеклянную пробирку или колбу через бумажный фильтр «белая лента». Контроль pH фильтрата проводят с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения pH 6-8 с использованием концентрированной соляной кислоты или 20 %-го раствора гидроокиси натрия.

Пробирку или колбу с фильтратом закрывают пробкой, профильтрованный раствор перемешивают и используют для проведения ИФА в течение 2 ч.

7.3 Подготовка проб вина (красного и белого), пива и виноградного сока

Доводят температуру образца до 20-25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Аликвота исследуемого образца пива должна быть предварительно дегазирована умеренным нагревом при температуре 20-25 °С до исчезновения пузырьков газа. Нефильтрованное пиво перед дегазированием должно быть предварительно отфильтровано через бумажный фильтр.

В пробирку вместимостью 15 мл отбирают 3 мл вина/пива/виноградного сока, добавляют 5,7 мл 100 % метанола и тщательно перемешивают на вортексе. Далее содержимое пробирки доводят до значения pH 6,5-7,5 с использованием 20 %-го раствора гидроокиси натрия и используют для проведения анализа в течение 2 ч. Фактор разведения 0,58.

7.4 Подготовка проб обжаренного молотого и растворимого кофе

Навеску пробы кофе массой (5,0±0,1) г помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляют 25 мл хлористого метилена и 125 мкл 35 %-й ортофосфорной кислоты, приготовленной в соответствии с п. 6.4. Коническую колбу закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на встряхивателе при 150 об/мин в течение 15 мин, затем пробу фильтруют через бумажный фильтр «белая лента». Отбирают 5 мл фильтрата в чистую центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, добавляют 1,65 мл карбонат-бикарбонатного буфера, приготовленного в соответствии с п.6.3, и центрифугируют 5 минут при 4000 g и температуре 20-25 оС. Переносят 0,5 мл верхнего (водного) слоя в чистую стеклянную пробирку, добавляют 1 мл 100 % метанола, закрывают пробкой, раствор перемешивают и используют для проведения анализа в течение 2 ч.

7.5 Подготовка проб сухофруктов

Навеску исследуемой пробы массой (5,0±0,1) г гомогенизируют с помощью блендера или гомогенизатора, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и цилиндром добавляют 25 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода=70:30. Важно соблюдать соотношение масса пробы : объем экстрагирующей смеси = 1:5. Коническую колбу закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на ротаторе при 150 об/мин в течение 5-7 мин. Затем раствор фильтруют через бумажный фильтр «белая лента». Контроль pH фильтрата проводят с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения pH 6-8 с использованием концентрированной соляной кислоты или 20 %-го раствора гидроокиси натрия.

Пробирку или колбу с фильтратом закрывают пробкой, профильтрованный раствор перемешивают и используют для проведения ИФА в течение 2 ч.

7.6 Подготовка проб зеленых, сочных и грубых кормов

Навеску высушенной до постоянной массы исследуемой пробы гомогенизируют с помощью блендера или гомогенизатора, взвешивают $(5,0 \pm 0,1)$ г пробы и помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл и цилиндром добавляют 25 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода=70:30. Важно соблюдать соотношение масса пробы : объем экстрагирующей смеси = 1:5. Пробирку закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на ротаторе при 150 об/мин в течение 5-7 мин. Содержимое в пробирке центрифугируют в течение 10 мин при 4000 g и температуре 20-25 °С. Переносят надосадочную жидкость в пробирку или колбу и проводят контроль pH с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения pH 6-8 с использованием 20 %-го раствора гидроксида натрия.

Полученный раствор перемешивают и используют для проведения ИФА в течение 2 ч.

8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

8.1 Перед проведением ИФА компоненты набора, подготовленные реагенты и исследуемые пробы выдерживают при температуре (20-25) °С в течение не менее 60 мин. Перед использованием жидкие реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием, избегая образования пены.

8.2 Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб в микропланшетах согласно таблице 2, с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и раствора пробы потребуется по две лунки (при исследовании проб в дубликатах).

Таблица 2 – Схема расположения лунок (при исследовании проб в дубликатах)

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₀	C ₀	П ₄	П ₄								
B	C ₁	C ₁	П ₅	П ₅								
C	C ₂	C ₂	П ₆	П ₆								
D	C ₃	C ₃	П ₇	П ₇								
E	C ₄	C ₄	П ₈	П ₈								
F	П ₁	П ₁	П ₉	П ₉								
G	П ₂	П ₂	П ₁₀	П ₁₀								
H	П ₃	П ₃	П ₁₁	П ₁₁								

Примечания:

1. С₀-С₄ – градуировочные растворы в лунках А-Е стрипов №1 и №2, П1-П11 – растворы проб в лунках F-H стрипов №1 и №2 и в лунках А-Н стрипов №3 и № 4.

2. Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальную пипетку. Не следует использовать более 4 стрипов в одной группе исследований.

8.3 Подготовка иммуносорбента

Планшетный иммуносорбент освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно помещают в фольгированный пакет, герметично заклеивают его клейкой лентой и хранят в холодильнике при температуре (2-8) °С в течение 6 месяцев, но не дольше срока годности набора.

8.4 Планшет для смешивания конъюгата и проб освобождают от упаковочного пакета. Необходимое количество стрипов, равное количеству стрипов иммуносорбента, устанавливают в рамку. Схема маркировки этих стрипов аналогична схеме маркировки иммуносорбента. Неиспользованные стрипы помещают в пакет и хранят при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности набора.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выполняют ИФА согласно приведенной в таблице 3 схеме и описаниям этапов.

9.1 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят конъюгат в объеме из расчета 1,0 мл на стрип.

С помощью восьмиканального дозатора в лунки планшета для смешивания вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, приготовленного в соответствии с п.6.6 (допускается использование одноканального дозатора). Затем в лунки планшета для смешивания в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 50 мкл градуировочных растворов в порядке возрастания их концентраций и растворов исследуемых проб, приготовленных в соответствии с п. 7.

При проведении одного единичного измерения для градуировочных растворов и растворов проб в лунки вносят по одной аликвоте этих растворов способом, описанным выше.

9.2 Используя восьмиканальную пипетку с новыми наконечниками, аккуратно перемешивают содержимое лунок стрипа в планшете для смешивания путем пипетирования раствора вверх и вниз 3-4 раза, не допуская образования пены, и немедленно переносят по 100 мкл полученной смеси в соответствующие лунки иммуносорбента.

Примечание – временной интервал от начала перемешивания до начала инкубирования – не более 3 мин.

9.3 Иммуносорбент заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре (20-25) °С в течение 10 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет.

9.4 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем с помощью восьмиканальной пипетки промывают лунки 4 раза по 200 мкл каждую рабочим промывочным раствором (п.6.5), который предварительно вносят в чистую ванночку в объеме из расчета 6,5 мл на один стрип.

При промывании планшета необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости; не допускают переполнения лунок и перетекания промывочного раствора между ними. Остатки жидкости удаляют, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

9.5 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят хромоген-субстратный раствор из расчета 1,0 мл на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрывают планшет изолирующим листком или крышкой и инкубируют в течение 5 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре (20-25) °С.

9.6 Останавливают ферментативную реакцию путем добавления во все лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента, предварительно внесенного в чашку Петри или пластмассовую кювету из расчета 1,0 мл на стрип. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 В течение не более 15 мин после остановки реакции измеряют в планшетном спектрофотометре оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм.

10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Для построения градуировочного графика и расчета массовой доли ОТА в анализируемых образцах используют файл для расчетов Microsoft Excel, предоставляемый по запросу, или программное обеспечение стороннего производителя (например, встроенное программное обеспечение микропланшетного фотометра), после внесения необходимых параметров данного ИФА. В расчетную программу введены условные значения концентраций ОТА в градуировочных растворах в терминах массовых долей (мкг/кг) с учетом установленного фактора разведения при пробоподготовке.

10.2 На основании внесенных оператором в таблицу раздела 1 файла для расчетов Microsoft Excel оптических плотностей градуировочных растворов, строится градуировочный график зависимости $\log_{10} B_i/B_0$ (ось ординат) от десятичного логарифма концентрации $\log C_i$ (ось абсцисс):

$$\log_{10} B_i/B_0 = \lg (B_i/B_0 / 1 - B_i/B_0),$$

где V_i – значение оптической плотности для i -го градуировочного раствора, о.е, (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

V_0 – значение оптической плотности для градуировочного раствора C_0 , о.е, (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

C_i – массовая доля ОТА в градуировочном растворе, выраженная в мкг/кг.

Программа автоматически рассчитывает на основании градуировочного графика массовую долю ОТА в мкг/кг в лунках с анализируемой пробой после внесения оператором значений оптической плотности в о.е, в соответствующие графы таблицы раздела 2 файла для расчетов.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов измерений двух параллельных проб одного образца.

При проведении единичного измерения (одной пробы образца), за окончательный результат принимают полученное значение единичного измерения.

Полученный результат округляют до первого десятичного знака.

В случае анализа вина и пива учитывают фактор разбавления F , равный 0,58.

10.3 В случае, когда массовая доля ОТА в растворе исследуемой пробы превышает максимальное значение массовой доли ОТА в градуировочном растворе C_4 , то есть, когда результат измерений оптической плотности раствора пробы менее оптической плотности градуировочного раствора с концентрацией 40,0 мкг/кг, проводят разбавление подготовленного раствора исследуемой пробы, используя для разбавления раствор в объемном соотношении метанол:вода=70:30. Полученный результат измерений вносят в таблицу раздела 2 с указанием фактора разведения. Программа автоматически вычислит массовую долю ОТА в мкг/кг в анализируемой пробе.

11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАБОРА

11.1 Параметры ИФА для градуировочных растворов – связывание конъюгата охратоксина с пероксидазой: V_0 – от 1,6 до 2,8 о.е; V_1/V_0 – не более 95 %, V_4/V_0 – не более 35 %.

11.2 Чувствительность: минимальная концентрация ОТА в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью набора, не превышает 1,0 мкг/кг.

11.3 Специфичность. В наборе МУЛЬТИСКРИН® Охратоксин А при изготовлении иммуносорбента используются высокоспецифичные антитела к ОТА.

11.4 Диапазон измерений составляет от 1,5 до 40,0 мкг/кг. Диапазон измерения для кормов и продукции комбикормовой промышленности; зеленых, сочных и грубых кормов от 2,0 до 40,0 мкг/кг.

11.5 Извлечение (открытие) добавки ОТА в холостом образце продукта – не менее 75 %.

11.6 Повторяемость (коэффициент вариации) результатов определения ОТА в контрольных пробах различных видов продуктов в одной постановке ИФА не превышает 15 %.

11.7 Воспроизводимость (коэффициент вариации) результатов определения ОТА в контрольных пробах различных видов продуктов в нескольких постановках ИФА в лаборатории не превышает 25 %.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1 Набор хранят в упаковке изготовителя при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности, не допуская замораживания.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев от даты изготовления.

13 ОБЗОР ВЕРСИЙ

Номер версии	Описание изменений
1.0	-
2.0	п. 7 – изменено название п. 7.3 – изменен фактор разбавления для пива п. 7.6. – добавлена пробоподготовка для зеленых, сочных и грубых кормов п. 11.2 – увеличена чувствительность набора п. 11.4 – изменен диапазон измерений набора

Таблица 3 – Схема анализа

Разбавление концентрата конъюгата и концентрата промывочного раствора		Разбавить необходимое количество концентрата конъюгата раствором для разведения конъюгата и концентрата промывочного раствора дистиллированной водой.
Подготовка иммуносорбента		Вставить необходимое количество стрипов с иммобилизованными антигенами
Подготовка планшета для смешивания		Вставить необходимое количество стрипов
<i>Планшет для смешивания</i>		
Внесение рабочего раствора конъюгата		Добавить по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Внесение градуировочных растворов и растворов анализируемых проб		Добавить по 50 мкл градуировочного раствора и подготовленного раствора пробы в соответствующую лунку
<i>Иммуносорбент</i>		
Перенесение содержимого из планшета для смешивания в иммуносорбент		Перенести по 100 мкл перемешанных проб из планшета для смешивания в соответствующие лунки иммуносорбента
Инкубация		Выдержать 10 мин при температуре (20-25) °С в темноте
Промывание		Промыть четыре раза промывочным раствором порциями по 200 мкл на каждую лунку
Внесение хромоген-субстратного раствора		Добавить по 100 мкл в каждую лунку и выдержать 5 мин в темноте при температуре (20-25) °С
Внесение стоп-реактанта		Добавить по 100 мкл в каждую лунку
Измерение оптической плотности		Измерить на микропланшетном фотометре, длина волны 450 нм