

Триметоприм ИФА

5101TMP [2]01.24

Иммуноферментный метод для скрининга и количественного определения
триметоприма в различных матрицах

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор
в России:**

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 911 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 444 05 50



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

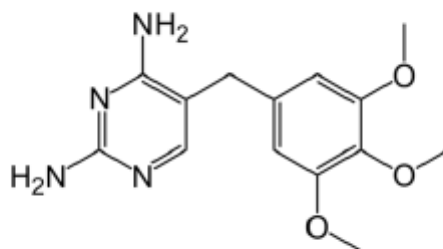
+375 17 336 50 54



КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

ИФА Триметоприм – это конкурентный иммуноферментный анализ для скрининга и количественного определения триметоприма в различных продуктах. Набор рассчитан на 96 анализов. Пробы и стандарты измеряются в двух параллелях, поэтому с помощью данной тест-системы можно проанализировать максимум 41 пробу. Набор содержит все реагенты для проведения теста, в том числе реагенты для пробоподготовки.

1. ВВЕДЕНИЕ



Химическая структура триметоприма

Триметоприм (ТМП) относится к ингибиторам дигидрофолатредуктазы и широко применяется в сочетании с сульфаниламидами (наряду с другими антибиотиками) для лечения инфекционных заболеваний животных. Предельно допустимые остатки ТМР установлены во всем мире. В Европейском союзе действует ограничение максимального остатка в 50 мкг/кг в свинине, курице и рыбе.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

В состав тест-системы входит предварительно сенсibilизированный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок). В лунки добавляют меченый пероксидазой хрена (-HRP) ТМР и стандартный раствор или образец. Свободный ТМР из образцов или стандартов и конъюгат ТМР-HRP конкурируют за специфические сайты связывания антител (конкурентный иммуноферментный анализ).

После инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре несвязанные реагенты удаляются промывкой планшета. Количество связанного конъюгата ТМР-HRP визуализируется путем добавления раствора субстрата/хромогена (тетраметилбензидина, ТМВ). Связанный конъюгат ТМР-HRP превращает бесцветный хромоген в окрашенный раствор.

Реакция с субстратом останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность окраски измеряется методом фотометрии при 450 нм. Оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации ТМР в образце.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного тест-набора ИФА используются кроличьи антитела к триметоприму ТМР, конъюгированному белком.

Перекрестная чувствительность:

Триметоприм 100%

Перекрестная реактивность определяется в буферной системе. Зарегистрированные значения могут отличаться в образцах из-за влияния матрицы.

Тест не может различать аналиты и перекрестно-реактивные вещества.

Предел обнаружения определен при оптимальных условиях. Значения CUT-OFF необходимо рассматривать критически.

Матрица	LOD (мкг/кг)	ССВ (мкг/кг)
Мясо	1.42	5
Рыба и креветки	1.79	5
Молоко и сухое молоко	1.92	5
Яйца	0.66	4
Моча	1.32	5

Если результаты, полученные для образца, не соответствуют требованиям, результаты должны быть проверены повторным анализом образца с использованием подтверждающего метода.

4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

Набор и компоненты набора следует хранить при температуре от 2°C до 8°C в темном месте. При повторном использовании храните компоненты набора, как указано в главе 9.

- После истечения срока годности набора и/или компонентов гарантия качества больше не действует.
- Перед использованием доведите все компоненты набора, включая микротитровальный планшет, до комнатной температуры.
- Разбавляйте компоненты набора непосредственно перед использованием, но после того, как компоненты будут доведены до комнатной температуры.
- Избегайте образования конденсата в лунках планшета. Доведите запечатанный планшет до температуры окружающей среды, прежде чем открывать его.
- Раствор хромогена для субстрата можно хранить в холодильнике (от 2°C до 8°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Следует избегать воздействия света на раствор хромогена.

Признаки порчи реагентов:

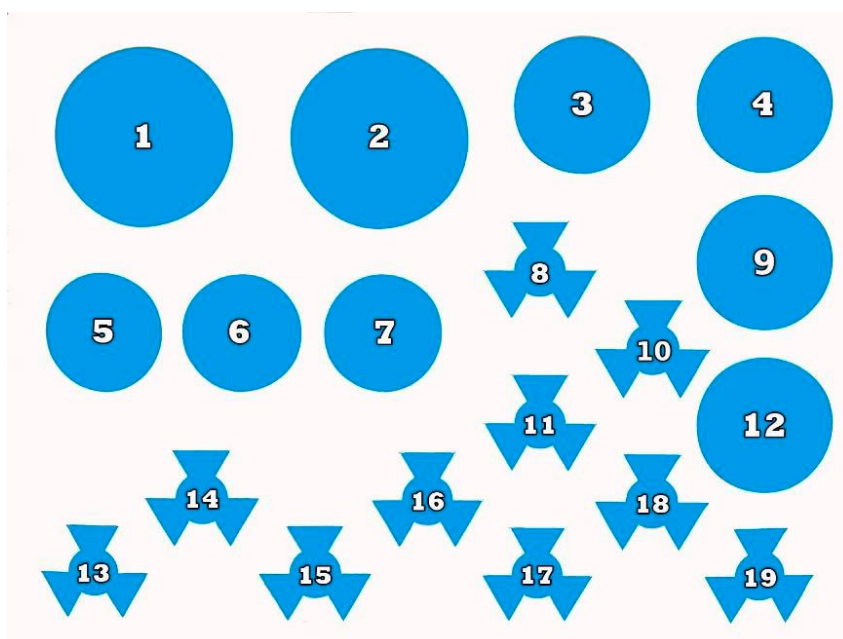
- Синее окрашивание раствора хромогена перед внесением его в лунки.
- Слабая цветовая реакция или ее отсутствие в лунках с нулевым стандартом ($E_{450\text{ нм}} < 0,8$).

5. СОСТАВ НАБОРА

Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок), сенсibilизированный антителами. Планшет готов к использованию.

Позиции реагентов в наборе. Для приготовления реагентов смотрите раздел 9.



1. **Буфер для разведения проб** (20 мл, 4X концентрат)
2. **Буфер для промывки планшета** (30 мл, 20X концентрат)
3. **Раствор субстрата** (12 мл, готов к использованию)
4. **Стоп-реагент** (15 мл, готов к использованию)
5. **Раствор конъюгата** (лиофилизированный, синяя крышка)
6. **Не используется**
7. **Не используется**
8. **Не используется**
9. **Не используется**
10. **Не используется**
11. **Не используется**
12. **Не используется**
13. **Нулевой стандартный раствор** (2 мл, готов к использованию)
14. **Стандартный раствор 1** (1 мл, готов к использованию) 0,01875 нг/мл
15. **Стандартный раствор 2** (1 мл, готовый к использованию) 0,0375 нг/мл
16. **Стандартный раствор 3** (1 мл, готов к использованию) 0,075 нг/мл
17. **Стандартный раствор 4** (1 мл, готов к использованию) 0,15 нг/мл
18. **Стандартный раствор 5** (1 мл, готовый к использованию) 0,3 нг/мл
19. **Не используется**

6. ТРЕБУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ТЕСТ-НАБОРА

- пробирки с закручивающейся крышкой объемом 15 мл
- весы и емкости для взвешивания
- перчатки
- вытяжной шкаф
- гомогенизатор (вортекс, миксер)
- центрифуга
- автоматическое устройство для промывки планшетов либо многоканальный пипет-дозатор 100-300 мкл
- шейкер для микротитровальных планшетов
- микропланшетный фотометр с фильтром 450 нм
- стеклянные пробирки (10 - 15 мл)
- микропипетки, 100 - 1000 мкл
- мультипипетка с комбинированными наконечниками объемом 2,5 мл
- алюминиевая фольга или парафильм
- дистиллированная вода (бидест)
- метанол
- N-гексан

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Этот набор может содержать опасные вещества. Указания по опасности приведены в соответствующих паспортах безопасности (SDS).

- Избегайте контакта всех биологических материалов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не используйте пипетку ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не храните и не готовьте продукты, а также не наносите косметику в специально отведенной рабочей зоне.
- Не используйте компоненты с истекшим сроком годности и не используйте компоненты из разных партий.
- Каждая лунка в конечном итоге используется как оптическая кювета. Поэтому не прикасайтесь к нижней поверхности лунки, чтобы избежать повреждений и загрязнения.
- Все компоненты должны быть полностью растворены перед использованием. Обратите особое внимание на субстрат и рабочий буфер, которые кристаллизуются при температуре +4°C.

- Оптимальные результаты будут получены при строгом соблюдении этого протокола. Для поддержания высокой точности необходимо тщательное пипетирование и промывка на протяжении всей процедуры.

R-Biopharm Nederland не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлена ее продукция, соответствуют стандартному качеству. Нет никаких гарантий товарной пригодности данного продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. R-Biopharm Nederland не несет ответственности за какой-либо ущерб, включая специальный или косвенный ущерб, или расходы, возникающие прямо или косвенно в результате использования данного продукта.

8. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

8.1. Мясо, рыба, креветки, яйца, молоко, сухое молоко* и моча.

- Гомогенизируйте образец до получения однородной массы
- Перелейте 1 г или 1 мл гомогенизированного образца во флакон с завинчивающейся крышкой, добавьте 3 мл метанола, хорошо перемешайте (взбалтывайте в течение нескольких секунд).
- Добавьте 1 мл гексана, хорошо перемешайте (взбалтывайте в течение нескольких секунд)
- Перемешивайте в течение 10 минут
- Центрифугируйте в течение 10 минут при 4000g при 20°C – 25°C
- Удалите верхний слой гексана
- Разбавьте пробу в буфере для разбавления в 30 раз - например: 20 мкл экстрагированной пробы до 580 мкл буфера для разбавления
- Используйте 50 мкл на лунку в тесте ИФА (коэффициент разбавления 120)

*Образцы сухого молока

Восстановите сухое молоко в соответствии с инструкцией производителя.

9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед началом теста реагенты следует нагреть до комнатной температуры. Неиспользованные реагенты следует немедленно вернуть обратно на хранение при температуре от +2°C до +8°C. Перед использованием подготовьте свежие реагенты.

Микротитровальный планшет

Верните неиспользованные полоски в закрывающийся пакет с осушителем и храните при температуре от +2°C до +8°C для использования в последующих анализах. Сохраните также держатель полоски.

Промывочный буфер

Промывочный буфер поставляется в 20-кратной концентрации. Перед использованием приготовьте свежие растворы. На полоску расходуется 20 мл разбавленного буфера для полоскания (1 мл концентрированного буфера для полоскания + 19 мл дистиллированной воды).

Буфер для разбавления

Буфер для разбавления концентрируется в 4 раза. Перед разбавлением (20 мл буфера + 60 мл дистиллированной воды) концентрированный буфер должен быть комнатной температуры и тщательно перемешан. В концентрированном буфере могут выделяться осадки содержимого. Перед разбавлением дистиллированной водой хорошо перемешайте. Разбавленный буфер можно хранить при температуре от +2°C до +8°C.

Конъюгат

Смешайте флакон с лиофилизированным конъюгатом (Триметоприм-HRP) с 6 мл буфера для разведения, тщательно перемешайте и храните в темноте до использования.

Раствор субстрата/хромогена

Раствор субстрата/хромогена (готовый к применению) имеет тенденцию выпадать в осадок при температуре +4°C. Следите за тем, чтобы при использовании этот флакон был комнатной температуры (храните в темноте), и перемешайте содержимое перед пипетированием в лунки.

10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Протокол промывки

При ИФА между каждым этапом иммунологической инкубации должны удаляться несвязанные компоненты. Это достигается посредством соответствующей процедуры промывки. Очевидно, что каждая процедура промывания должна проводиться с большой осторожностью для гарантирования хороших результатов повторяемости и воспроизводимости.

В принципе, промывка вручную или с помощью автоматического вошера может осуществляться следующим образом:

Промывка вручную

1. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

2. Все лунки заполняют буфером для промывания до края лунки (300 мкл)

3. Этот процесс промывки (этапы 1 и 2) повторяют трижды.

4. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета

5. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

6. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

Промывание с помощью автоматического вошера

При использовании автоматического вошера проверьте, чтобы из всех лунок жидкость удалялась полностью, чтобы раствор для промывания тщательно распределялся, заполняя до края каждую лунку во время каждого цикла промывания. Вошер должен быть запрограммирован на выполнение трех циклов промывки.

Протокол анализа

1. Подготавливают образцы в соответствии с разделом 8 (Подготовка образцов) и реагенты в соответствии с разделом 9 (Подготовка реагентов).

2. Вносят 100 мкл нулевого градуировочного раствора в двух экземплярах (лунки G1, G2 = пустые)

Вносят 50 мкл нулевого градуировочного раствора (макс. опт. плотность) в двух экземплярах (лунки A1, A2, максимальный сигнал).

Вносят 50 мкл каждого градуировочного раствора в двух экземплярах (лунки с B1,2 по F1,2, т.е. 0,01875, 0,0375, 0,075, 0,15 и 0,3 нг/мл).

3. Вносят по 50 мкл каждого образца в двух экземплярах в оставшиеся лунки планшета для микротитрования (41 образец/ 82 лунки)

4. Вносят по 50 мкл разбавленного конъюгата во все лунки за исключением G1 и G2.

5. Планшет запечатывают и перемешивают в течение нескольких секунд его содержимое (на шейкере для микротитровальных планшетов либо аккуратными круговыми движениями).

6. Планшет инкубируют в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре (20-25°C).

7. Удаляют раствор из микротитровального планшета и промывают 3 раза буфером для промывания.

8. Вносят по 100 мкл раствора субстрата во все лунки.

9. Тщательно перемешивают и инкубируют планшет в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре (20°C - 25°C).

10. Вносят по 100 мкл стоп-реагента во все лунки.

11. Сразу же измеряют оптическую плотность при 450 нм.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычитите среднее значение оптической плотности (ОП) для лунок G1 и G2 (пустых) из отдельных значений ОП для лунок, содержащих градуировочные растворы и пробы.

Значения ОП для шести градуировочных растворов и проб (среднее значение двух повторностей) делят на среднее значение ОП нулевого градуировочного раствора (лунки A1 и A2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой градуировочный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения ОП приводятся в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{\text{ОП стандарта (или образца)}}{\text{ОП стандарта 0 нг/мл}} \times 100\% = \% \text{ от максимальной оптической плотности}$$

Калибровочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для градуировочных растворов, наносятся на график (по оси Y) напротив эквивалентной концентрации триметоприма TMP (мкг/мл) по логарифмической оси X.

Альтернативный вариант калибровочной кривой:

Значение поглощения, рассчитанное для стандартов, наносится на график по оси Y в зависимости от эквивалентной концентрации анализируемого вещества по логарифмической оси X

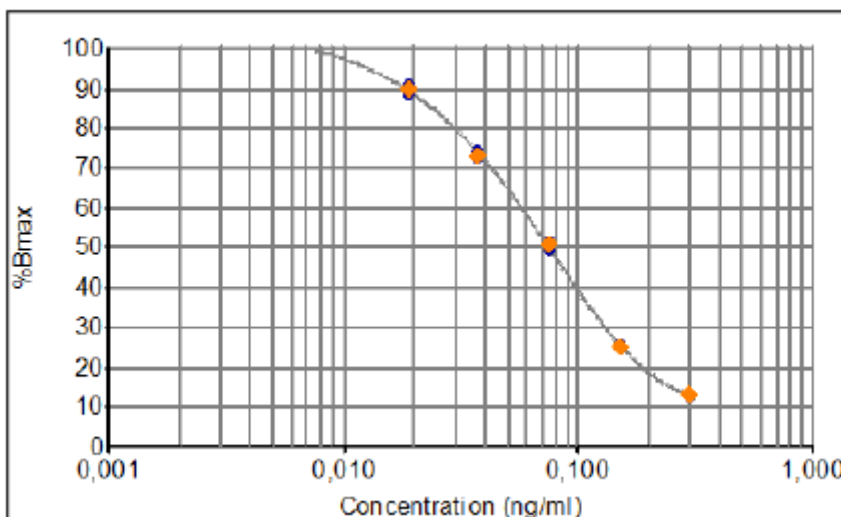


Рисунок 1. Пример калибровочной кривой

Количество триметоприма TMP в пробе выражается как эквивалент триметоприма TMP. Эквивалент триметоприма TMP в пробе (нг/мл), соответствующий % от максимальной оптической плотности каждого экстракта, может быть получен по калибровочной кривой.

8.1. Мясо, рыба, креветки, яйца, молоко, сухое молоко, моча

Эквиваленты TMP, показанные на стандартной кривой, следует умножить на коэффициент 120, чтобы получить содержание TMP в мясе, рыбе, креветках, яйцах, молоке, сухом молоке и образцах мочи, выраженное в мкг/кг.

12. ЛИТЕРАТУРА

- Chair, M., Nelis, H., Leger, P., Sorgeloos, P., & De Leenheer, H. (1996). Accumulation of Trimethoprim, Sulfamethoxazole, and N-Acetylsulfamethoxazole in Fish and Shrimp Fed Medicated Artemia franciscana. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1649–1652.
- EMEA. (2002). Trimethoprim. European Medicines Evaluation Agency, 1-2.
- Huovinen, P. (1987). Trimethoprim Resistance. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 1451-1456.

13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для заказа тест-набора используйте артикул 5101TMP.

14. ИСТОРИЯ ИЗМЕНЕНИЙ

Первая версия.