

## **ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин**

Тест-система для определения колистина в пищевой продукции животного происхождения, кормах и кормовых добавках  
методом иммуноферментного анализа

ТУ ВУ 100185129.198-2023

Разработано  
в Институте биоорганической химии  
НАН Беларуси

Изготовлено в производственной кооперации  
с ОДО «КомПродСервис»

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

***Техническая поддержка***

**ОДО «КомПродСервис»**

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

[www.komprod.com](http://www.komprod.com)

support@komprod.com

+375 17 336 50 54

**Официальный дистрибьютор в России:**

**ООО "НеоТест"**

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 911 02 01

info@neo-test.ru

[www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru)

***Техническая поддержка***

support@neo-test.ru



## **1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**

1.1 Тест-система ИФА-Колистин предназначена для количественного определения колистина в пищевой продукции животного происхождения, кормах и кормовых добавках методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа для контроля безопасности продукции.

1.2 Антибиотик колистин, впервые выделенный из культуральной жидкости *Bacillus coliclinus* в 1947 году, является циклическим пептидом, у которого 9 аминокислот образуют цикл, а треонин, два остатка диаминомасляной кислоты и остаток 6-метилоктановой (колистин А) или 6-метилгептановой кислоты (колистин В) объединены в боковую цепочку. Присутствие антибиотика в кормах и пищевой продукции вызывает ряд необратимых патологических изменений в организме, представляющих серьёзную угрозу для здоровья человека и животных, и наносит большой экономический ущерб сельскому хозяйству. Во многих странах мира существует обязательная система контроля пищевой продукции и кормов на наличие основных антибиотиков. Для Беларуси и стран Таможенного союза ЕАЭС установлены единые предельно допустимые уровни содержания Кп: в мясе продуктивных животных, объектах аквакультуры животного происхождения, мясной и рыбной продукции, печени, жире и пищевой продукции их содержащей \* – 150 мкг/кг, в почках и пищевой продукции их содержащей \* – 200 мкг/кг, яйцах и яйцепродуктах – 300 мкг/кг, молоке и молочной продукции – 50 мкг/кг. Такие же нормы для продовольственного сырья установлены и в странах ЕС.

1.3 Тест-система рассчитана на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов и 6 градуировочных растворов при использовании всех стрипов одновременно, всего 96 определений. При необходимости набор может быть разделен на 2–4 независимые части с различным количеством исследуемых образцов. Для каждой постановки необходимо построение нового градуировочного графика.

Продолжительность анализа составляет 1,5-2,0 ч с учетом количества исследуемых образцов и времени, необходимым для проведения пробоподготовки.

## **2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ**

2.1 В состав тест-системы входят компоненты, представленные в табл. 1.

2.2 Принцип работы тест-системы. Определение содержания колистина проводят методом прямого конкурентного иммуноферментного

---

\* в качестве основного компонента животного происхождения.

анализа (ИФА). колистин экстрагируют из измельченных образцов водными растворами. В лунки планшета, на стенках которых иммобилизованы поликлональные антитела к колистину, добавляют градуировочные растворы или подготовленные к анализу разведенные экстракты исследуемых образцов. Во время последующей инкубации колистин в составе градуировочного раствора или разведенного экстракта исследуемого образца конкурирует с колистином, конъюгированным с пероксидазой из корней хрена, за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Таблица 1 – Состав тест-системы

Компонент	Количество
1 Иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
2 Градуировочные растворы С <sub>0</sub> , С <sub>1</sub> , С <sub>2</sub> , С <sub>3</sub> , С <sub>4</sub> , и С <sub>5</sub> с массовой концентрацией колистина – 0; 0,1; 0,25; 1,0; 3,0 и 6,0 мкг/л, готовы к использованию	6 пробирок, 1,0 мл
3 Конъюгат, 50-икратный концентрат	1 пробирка, 0,2 мл
4 Раствор для разведения конъюгата	1 флакон, 7,0 мл
5 Раствор <b>А</b> , 4-кратный концентрат	1 флакон, 85 мл
6 Раствор <b>А</b> <sub>1</sub>	1 флакон, 35 мл
7 Раствор <b>Б</b>	1 флакон, 22 мл
8 Раствор <b>В</b> для разведения экстрактов	1 флакон, 42 мл
9 Раствор ТМБ	1 флакон, 1,6 мл
10 Субстратный буферный раствор	1 флакон, 14 мл
11 Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл
12 Моющий буфер, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл
13 Спайк препарат колистина, массовая концентрация колистина – 2,0 мг/л	1 пробирка, 0,5 мл

После промывания микропланшета в лунки добавляют хромоген-субстратную смесь, превращающуюся под действием фермента в составе связанного с антителами конъюгата в окрашенный продукт, количество которого обратно пропорционально содержанию колистина в исследуемом 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, выраженную в оптических единицах (о.е.), измеряют на многоканальном планшетном фотометре при длине волны 450 нм. Измеренные значения интенсивности оптической плотности вносят в прилагаемый для подсчета результатов шаблон программного обеспечения, совместимого с Microsoft Excel, в котором производится построение градуировочного графика и автоматически рассчитывается концентрация колистина в исследуемых образцах с учетом кратности их разведения. Значения массовой концентрации колистина в градуировочных пробах оттестированы относительно сертифицированного референсного материала колистина, поставляемого в растворе («Dr. Ehrenstorfer», кат. № DRE-A11693500WA-100, Германия).

### **3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ**

3.1 При работе с тест-системой следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

3.2 Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с исследуемыми образцами, экстрактами и градуировочными растворами, так как они могут содержать колистин, обладающий токсичными свойствами.

Стоп-реагент и растворы для экстракции колистина обладают 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 используются при работе с тест-системой, 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 ТЕСТ-СИСТЕМОЙ**

4.1 Реагенты, экстракты проб, градуировочные растворы и другие растворы, применяемые в анализе, необходимо отбирать отдельными чистыми наконечниками для дозаторов.

4.2 Не допускается использование тест-системы после окончания срока годности.

4.3 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из разных серий данной тест-системы или отдельные компоненты из тест-систем других изготовителей.

4.4 Для приготовления каждого реагента необходимо использовать отдельную стеклянную емкость или одноразовые емкости из полипропилена. Вся используемая для приготовления реагентов стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта хромовой смесью и 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. Во всех случаях следует избегать образования пены.

4.6 Если выполнение ИФА начато, то все последовательные стадии следует заканчивать, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени и температуре, выдерживая установленную продолжительность инкубации. Следует исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА. При проведении анализа растворы в каждую лунку вносятся отдельными чистыми наконечниками.

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

## **5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

5.1 При работе с тест-системой 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 II класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и погрешностью взвешивания  $\pm 0,01$  г.

Восьмиканальный дозатор переменного объема 0,050-0,300 см<sup>3</sup> с пределом допускаемой погрешности не более 3 %.

Одноканальные дозаторы переменного объема: 0,020-0,200 см<sup>3</sup> с погрешностью дозирования не более 2 %; 0,100-1,000 см<sup>3</sup> и 1,000-5,000 см<sup>3</sup> с погрешностью дозирования не более 1,5 % со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

Лабораторный ротатор, скорость вращения не менее 25 об/мин.

Вортекс.

Гомогенизатор или бытовой блендер.

Секундомер или таймер.

Термостат, обеспечивающий температуру (20-25) °С.

Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру (2-8) °С с морозильной камерой, обеспечивающей температуру не выше минус 18 °С.

Стаканы вместимостью 100 и 500 см<sup>3</sup>.

Цилиндры вместимостью 50, 100 и 500 см<sup>3</sup>.

Пробирки полипропиленовые вместимостью 15 или 10 см<sup>3</sup> с крышками для экстракции и центрифугирования.

Пробирки полипропиленовые вместимостью 2,0-2,5 см<sup>3</sup> или 4,0-5,0 см<sup>3</sup> или эппендорфы с крышками вместимостью 1,5-2,0 см<sup>3</sup> для разведения экстрактов.

Пленка «парафильм» или скотч.

Чашки Петри стеклянные многоразовые (диаметр 100 мм, высота 15 мм) или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканального дозатора.

Штатив для пробирок.

Перчатки резиновые или пластиковые.

Вода дистиллированная или деионизованная.

5.2 Реактивы, используемые в работе.

Гексан х.ч. ТУ 2631-00305807999-98.

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

## **6 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ**

6.1 Приготовление рабочего раствора А для экстракции колистина из молочных и составных молочных продуктов плотной консистенции, мороженого на молочной основе, концентрированного и сгущенного молока, яиц и яичепродуктов, животных жиров и пищевой продукции их содержащей, пчелиного меда. В стеклянном или пластиковом стакане смешивают один объем раствора А (4-кратный концентрат) и три объема дистиллированной или деионизованной воды. Полученный раствор хранят в холодильнике при температуре (2-8) °С в течение всего оставшегося срока годности набора.

Приготовление раствора для экстракции колистина из мяса, почек, печени продуктивных животных, объектов аквакультуры животного происхождения и пищевой продукции их содержащей, комбикормов и кормовых добавок. В стеклянном или пластиковом стакане смешивают девять объемов рабочего раствора А и один объем раствора А<sub>1</sub> из расчета 4,00 см<sup>3</sup> полученного раствора для экстракции колистина, умноженные на

количество исследуемых образцов плюс еще 2,000 см<sup>3</sup>. Изготовленный раствор хранят в течение часа при комнатной температуре.

6.2 Приготовление рабочего раствора конъюгата. Микропробирку с концентратом конъюгата необходимо предварительно отцентрифугировать в течение 1 мин при 1000 g. Для одного стрипа требуется 0,400 см<sup>3</sup> рабочего раствора конъюгата, которые умножаются на требуемое для анализа количество стрипов плюс 0,500 мл. Для получения требуемого объема необходимо к одному объему концентрата конъюгата добавить 49 объемов раствора для разведения конъюгата, тщательно перемешать, не допуская образования пены. Раствор не подлежит хранению, готовится непосредственно перед использованием.

Примечание: конъюгат может поставляться в виде готового для работы компонента.

#### 6.3 Приготовление рабочего раствора моющего буфера.

Содержимое флакона с концентратом моющего буфера интенсивно перемешивают в течение 10-20 сек. Рабочий моющий буфер готовят в стакане вместимостью 500 см<sup>3</sup>, используя мерные цилиндры, вносят один объем концентрата и девять объемов дистиллированной или деионизированной воды, перемешивают. Полученный раствор хранят в емкости с плотно закрывающейся крышкой при температуре (2-8) °C в течение 1 месяца.

#### 6.4 Приготовление хромоген-субстратного раствора

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

Раствор ТМБ разводят субстратным буферным раствором в 10 раз (соотношение по объему 1 к 9) из расчета 0,100 см<sup>3</sup> на каждую из заданного количества лунок плюс добавочный 1,00 см<sup>3</sup>. Для этого в чистый флакон вносят один объем раствора ТМБ и девять объемов субстратного буферного раствора, 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 поставляемый в наборе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием полученный хромоген-субстратный раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств или используют одноразовую посуду. Для пипеточных дозаторов необходимо использовать только новые наконечники.

## **7 ОТБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРОБ**

7.1 Отбор образцов проводят по СТБ 1036 или другим ТНПА на конкретные виды продукции. При необходимости отобранные образцы хранят в защищенном от света месте при температуре (2-8) °С не более 1 сут или в замороженном виде при температуре не выше минус 18 °С не более 14 сут. Перед проведением подготовки проб в соответствии с 9.4 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре (2-8) °С. Жидкие образцы тщательно перемешивают, плотные образцы измельчают с помощью гомогенизатора или блендера. Перед измерением образцы должны быть доведены до температуры (20-25) °С.

### **7.2 Экстракция Кл из мяса, печени, почек продуктивных животных, объектов аквакультуры животного происхождения и пищевой продукции их содержащей.**

В двух полипропиленовых пробирках для центрифугирования вместимостью 10 или 15 см<sup>3</sup> взвешивают по (1,00±0,01) г измельченного исследуемого образца и добавляют в каждую по 4,00 см<sup>3</sup> раствора, приготовленного согласно 6.1, и по 1,00 см<sup>3</sup> гексана. Смесь энергично встряхивают вручную до однородного состояния (примерно 30 с) и перемешивают в течение 10 мин на ротаторе со скоростью 25 об/мин.

Затем смесь центрифугируют 10 мин при 4000 g и температуре (20-25)°С.

Примечание: после центрифугирования осадки в пробирке будут расположены на дне и сверху, на границе между водным раствором и гексаном. Наконечником дозатора протыкают слой гексана и осадка на границе гексана и водного экстракта, после чего медленно, до первого упора, выдавливают воздух из наконечника в водный раствор, не допуская взмучивания осадков, и отбирают 0,025 см<sup>3</sup> водного экстракта. Отбор экстрактов производят сухими чистыми наконечниками. Аналогичным образом проводится отбор экстракта для всех матриц.

0,025 см<sup>3</sup> водного экстракта (раствор между осадком внизу пробирки и осадком, расположенным сверху, между гексаном и водным раствором) разводят 0,475 см<sup>3</sup> раствора В для разведения экстрактов и перемешивают. Для анализа отбирают 0,050 см<sup>3</sup>.

Фактор разведения – **100**.

### **7.3 Экстракция Кл из комбикормов и кормовых добавок.** Экстракцию Кл и отбор водного экстракта проводят согласно 7.2.

0,025 см<sup>3</sup> водного экстракта (раствор между осадком внизу пробирки и осадком, расположенным сверху, между гексаном и водным раствором) разводят 0,975 см<sup>3</sup> раствора В для разведения экстрактов и перемешивают. Для анализа отбирают 0,050 см<sup>3</sup>.

Фактор разведения – **200**.

**7.4 Экстракция колистина из молока, жидких и восстановленных сухих молочных и составных молочных продуктов, жидких побочных продуктов переработки молока, продукции детского питания на молочной основе и молочных смесей.** В двух полипропиленовых пробирках для центрифугирования вместимостью 10 или 15 см<sup>3</sup> взвешивают по (4,00±0,01) г исследуемого образца, добавляют по 0,250 см<sup>3</sup> раствора **Б** и по 1,00 см<sup>3</sup> гексана. Смесь несколько раз энергично встряхивают вручную до однородного состояния раствора и перемешивают в течение 10 мин на ротаторе со скоростью 25 об/мин.

Затем смесь центрифугируют 10 мин при 4000g и температуре (20-25)°С.

0,025 см<sup>3</sup> водного супернатанта (раствор между осадком внизу пробирки и осадком, расположенным сверху, между гексаном и водным раствором) разводят 0,475 см<sup>3</sup> раствора **В** для разведения экстрактов и перемешивают. Для анализа отбирают 0,050 см<sup>3</sup>.

Фактор разведения – **21,25**.

**7.5 Экстракция колистина из плотных молочных продуктов и плотных составных молочных продуктов, мороженого на молочной основе, концентрированного и сгущенного молока, яиц и яичепродуктов, животных жиров и пищевой продукции их содержащей, пчелиного меда.** В двух полипропиленовых пробирках для центрифугирования вместимостью 10 или 15 см<sup>3</sup> взвешивают по (1,00±0,01) г измельченного тестируемого образца, добавляют по 4,00 см<sup>3</sup> раствора **А**, приготовленного согласно 6.1, и по 1,00 см<sup>3</sup> гексана (пробы образцов шпика, сала, топленого жира, сливочного масла и иной пищевой продукции, содержащей животный жир, после внесения рабочего раствора **А**, подогревают на водяной бане при температуре (60-70) °С в течение 1-2 мин). Смесь энергично встряхивают вручную до однородного состояния (примерно 30 с) и перемешивают в течение 10 мин на ротаторе со скоростью 25 об/мин.

Затем смесь центрифугируют 10 мин при 4000 g и температуре (20-25) °С.

0,025 см<sup>3</sup> водного супернатанта (раствор между осадком внизу пробирки и осадком, расположенным сверху, между гексаном и водным раствором) разводят 0,475 см<sup>3</sup> раствора **В** для разведения экстрактов и перемешивают. Для анализа отбирают 0,050 см<sup>3</sup>.

Фактор разведения – **100**, (для животных жиров и пищевой продукции, их содержащей, фактор разведения – **85**).

Не позднее 20 мин после центрифугирования полученные экстракты колистина необходимо развести раствором **В**. Разведенные экстракты следует использовать для проведения ИФА не позднее 1 ч после их приготовления (хранить при температуре (20-25)°С).

## 8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

8.1 Перед проведением ИФА компоненты набора выдерживают при комнатной температуре (20-25) °С в течение не менее 30 мин. Перед использованием жидкие реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием, избегая образования пены.

8.2 Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и разведенных экстрактов исследуемых образцов в микропланшетах согласно рисунку 1, с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и исследуемого образца требуется две лунки.

Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальный дозатор для внесения приготовленного раствора конъюгата, хромоген-субстратной смеси, стоп-реагента и рабочего моющего буфера.

Не рекомендуется использовать более 6 стрипов в одной группе исследований (время раскапывания градуировочных растворов и исследуемых образцов от первой до последней лунки в используемых стрипах не должно превышать 3 мин).

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	С <sub>0</sub>	С <sub>0</sub>	П <sub>3</sub>	П <sub>3</sub>	П <sub>11</sub>	П <sub>11</sub>						
В	С <sub>1</sub>	С <sub>1</sub>	П <sub>4</sub>	П <sub>4</sub>	П <sub>12</sub>	П <sub>12</sub>						
С	С <sub>2</sub>	С <sub>2</sub>	П <sub>5</sub>	П <sub>5</sub>	П <sub>13</sub>	П <sub>13</sub>						
Д	С <sub>3</sub>	С <sub>3</sub>	П <sub>6</sub>	П <sub>6</sub>	П <sub>14</sub>	П <sub>14</sub>						
Е	С <sub>4</sub>	С <sub>4</sub>	П <sub>7</sub>	П <sub>7</sub>	П <sub>15</sub>	П <sub>15</sub>						
Ф	С <sub>5</sub>	С <sub>5</sub>	П <sub>8</sub>	П <sub>8</sub>	П <sub>16</sub>	П <sub>16</sub>						
Г	П <sub>1</sub>	П <sub>1</sub>	П <sub>9</sub>	П <sub>9</sub>	П <sub>17</sub>	П <sub>17</sub>						
Н	П <sub>2</sub>	П <sub>2</sub>	П <sub>10</sub>	П <sub>10</sub>	П <sub>18</sub>	П <sub>18</sub>						

Рисунок 1 - С<sub>0</sub> – С<sub>5</sub> – градуировочные растворы, П<sub>1</sub> – П<sub>18</sub> – растворы разведенных экстрактов анализируемых образцов.

### 8.3 Подготовка иммуносорбента

Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку, оставшиеся стрипы помещают в пакет, который

**герметично** заклеивают липкой лентой и хранят в холодильнике при температуре (2–8) °С в течение оставшегося срока хранения тест-системы.

## **9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

Выполняют ИФА согласно приведенной в таблице 2 схеме и описаниям этапов.

9.1 В лунки планшета в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1 вносят по 0,050 см<sup>3</sup> градуировочных растворов в порядке возрастания концентрации колестина и подготовленные разведенные экстракты исследуемых образцов. Растворы в каждую лунку вносят отдельными наконечниками.

9.2 Затем в каждую лунку вносят по 0,050 см<sup>3</sup> рабочего раствора конъюгата. Содержимое лунок перемешивают, выполняя по поверхности стола планшетом не менее 10 круговых движений по часовой и 10 круговых движений против часовой стрелки.

9.3 Иммуносорбент заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при комнатной температуре (20–25) °С в течение 50 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света.

9.4 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем с помощью восьмиканального дозатора (или вошера) три раза промывают планшет рабочим раствором моющего буфера порциями по 0,200 см<sup>3</sup> на одно промывание каждой лунки, при этом раствор предварительно вносят в чистую кювету в требуемом объеме из расчета 5,00 см<sup>3</sup> на один стрип плюс добавочные 2–3 см<sup>3</sup>. При промывании планшета контролируют заполнение всех лунок и полное удаление моющего раствора; не допуская переполнения лунок и перетекания моющего 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, приготовленный по 6.4.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят по 0,100 см<sup>3</sup> хромоген-субстратного раствора. Закрывают планшет изолирующим листком или крышкой и инкубируют в течение 15 мин при температуре (20–25) °С в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света.

9.6 Останавливают ферментативную реакцию, внося во все лунки планшета по 0,100 см<sup>3</sup> стоп-реактанта, предварительно внесенного в чашку Петри или пластмассовую кювету, из расчета 0,80 см<sup>3</sup> на каждый стрип плюс

добавочный 1,00 см<sup>3</sup>. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 ОП растворов в лунках измеряют в планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм не позднее 15 мин после ингибирования ферментативной реакции.

9.8 Для проведения контроля правильности выполнения измерений используют спайк-препарат с массовой концентрацией колистина 2,0 мг/л. в качестве образцов для внесения добавки колистина должны быть использованы образцы, содержание колистина в которых ниже предела измерения тест-системой «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин». Внесение раствора спайк-препарата производится в пробирки с навесками исследуемых образцов непосредственно перед анализом и тщательно перемешивается.

Молоко, жидкие и восстановленные сухие молочные и составные молочные продукты, побочные продукты переработки молока, продукция детского питания на молочной основе и молочные смеси взвешивают в количестве (4,000±0,01) г и добавляют 0,050 см<sup>3</sup> спайк-препарата колистина. Содержание добавленного в образец колистина составляет 25 мкг/кг. Остальные измельченные матрицы, перечисленные в таблице 2, взвешивают в количестве (1,000±0,01) г и добавляют к ним по 0,050 см<sup>3</sup> спайк-препарата колистина. Пробоподготовку и проведение анализа проводят согласно разделам 7-9. Факторы разведения рассчитываются с учетом добавленного объема раствора колистина и равны 21,5 для жидких молочных продуктов, 85,85 – для животных жиров и жиросодержащей продукции, 202 – для комбикормов и кормовых добавок и 101 – для всех остальных перечисленных в таблице 2 матриц.

## **10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

10.1 Для построения градуировочного графика и расчета содержания колистина в исследуемых образцах используют прилагаемое программное обеспечение, совместимое с Microsoft Excel, поставляемое к тест-системе на компакт-диске по запросу. В программное обеспечение введены значения массовых концентраций колистина в градуировочных растворах (мкг/л).

10.2 На основании внесенных оператором в таблицу раздела 1 прилагаемого программного обеспечения параллельных измерений оптической плотности для каждого градуировочного раствора производится построение градуировочного графика зависимости  $V_i/V_0 \cdot 100\%$  (ось ординат) от концентрации  $C_i$  (ось абсцисс), где:

$V_i$  – среднее арифметическое значение измеренной оптической плотности для  $i$ -го градуировочного раствора, о.е,

$V_0$  – среднее арифметическое значение измеренной оптической плотности для градуировочного раствора  $C_0$ , не содержащего колистин, о.е,

$C_i$  – массовая концентрация колистина в градуировочном растворе, мкг/л.

После внесения оператором измеренных значений оптической плотности и фактора разведения в соответствующие графы таблицы поставляемого программного обеспечения по градуировочному графику автоматически рассчитывается содержание колистина в исследуемых образцах в мкг/кг.

За окончательный результат измерения содержания колистина в исследуемом образце принимают среднее арифметическое значение двух параллельных проб одного и того же исследуемого образца, при этом полученный результат округляют до трех значащих цифр.

## **11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ**

11.1 Параметры ИФА для градуировочных растворов: оптическая плотность для градуировочного раствора  $C_0$  находится в диапазоне от 1,3 до 2,8 о.е.

11.2 Специфичность. В тест-системе ИФА-Колистин при изготовлении иммуносорбента используются высокоспецифичные антитела, проявляющее кросс-реактивность к колистину, равную 100 %, к полимиксину В – менее 3,0 %, к цинк бацитрацину А, стрептомицину и пенициллину G – менее 0,01 %.

11.3 Диапазон измерений для каждой тестируемой матрицы указан в таблице 2.

11.4 Извлечение (открытие) добавки колистина в холостом образце продукта – не менее 75 %.

11.5 Повторяемость (коэффициент вариации) результатов определения колистина в градуировочной пробе  $C_3$  в одной постановке ИФА не превышает 15 %.

Таблица 2 – Диапазоны измерений для пищевой продукции животного происхождения, комбикормов и кормовых добавок.

Матрица	Диапазон измерений, мкг/кг
Мясо, печень, почки продуктивных животных, объекты аквакультуры животного происхождения и пищевая продукция, их содержащая	от 10,0 до 600включ.
Молоко, жидкие и восстановленные сухие молочные и составные молочные продукты, побочные продукты переработки молока, продукция детского питания на молочной основе и молочные смеси	от 2,50 до 125включ.
Молочные продукты и составные молочные продукты плотной консистенции, мороженое на молочной основе, концентрированное и сгущенное молоко, яйца и яйцопродукты, пчелиный мед	от 10,0 до 600 включ.
Животные жиры и пищевая продукция их содержащая	от 10,0 до 510 включ
Комбикорма и кормовые добавки	от 20,0 до 1200 включ.

## **12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ**

12.1 Тест-систему хранят в упаковке изготовителя при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности, замораживание не допускается.

12.2 Срок годности тест-системы – 12 месяцев от даты изготовления.

Таблица 3 – Схема анализа

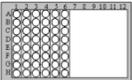
<p>Разведение экстрактов исследуемых продуктов</p>		<p>Смешать 0,475 см<sup>3</sup> раствора В и 0,025 см<sup>3</sup> экстракта (для комбикормов – 0,975 см<sup>3</sup> раствора В и 0,025 см<sup>3</sup> экстракта)</p>
<p>Подготовка иммуносорбента</p>		<p>Вставить необходимое количество стрипов с иммобилизованными антителами</p>
<p>Внесение градуировочных растворов и разведенных экстрактов</p>		<p>Добавить по 0,050 см<sup>3</sup> градуировочных растворов и разведенных экстрактов в соответствующие лунки</p>
<p>Внесение конъюгата</p>		<p>Добавить по 0,050 см<sup>3</sup> разведенного конъюгата в каждую лунку, перемешать</p>
<p>Инкубация</p>		<p>Выдержать при температуре (20-25) °С в темноте в течение 50 мин</p>
<p>Промывание</p>		<p>Промыть 3 раза рабочим раствором моющего буфера по 0,20 см<sup>3</sup> на каждую лунку</p>
<p>Внесение хромоген-субстратного раствора</p>		<p>Внести по 0,100 см<sup>3</sup> в каждую лунку и выдержать 15 мин в темноте при температуре (20-25) °С</p>
<p>Внесение стоп-реагента</p>		<p>Внести по 0,100 см<sup>3</sup> в каждую лунку, перемешать</p>
<p>Измерение оптической плотности</p>		<p>Измерить на микропланшетном фотометре, длина волны 450 нм</p>

Таблица 4 – Возможные проблемы анализа и пути их решения

Проблема	Причина	Решение
<b>1. Показания низкой абсорбции (оптическая плотность калибровочной пробы <math>C_0</math> ниже 1,3)</b>	Недостаточно конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные при разведении 50-кратного концентрата конъюгата (п. 6.2). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	В лунки микропланшета внесены неправильные объемы реагентов	Вносите в лунки реагенты в объемах, указанных в разделе 9. Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	Срок годности реагентов истек, неправильное хранение тест-системы	Обеспечьте правильное хранение тест-системы и не используйте ее после истечения срока годности (раздел 12).
	Продолжительность и температурные условия проведения стадий анализа ниже, требуемых по инструкции	Выдерживайте компоненты тест-системы при температуре (20 - 25) °C не менее 30 мин перед проведением анализа. Соблюдайте указанные в инструкции продолжительности стадий анализа. Выполняйте первую стадию анализа в течение 50 мин, вторую – в течение 15 мин при температуре (20 - 25) °C (п. 9.1.3 и 9.1.5)
	Концентрат моющего буфера не разбавлен	Убедитесь, что 10-кратный концентрат моющего буфера разбавлен дистиллированной водой в 10 раз перед использованием. Для приготовления рабочего раствора моющего буфера используйте дистиллированную или деионизованную воду надлежащего качества
	Стоп-раствор не добавлен	Добавьте стоп-реагент, чтобы получить желтую окраску продукта реакции, которую можно измерить при 450 нм (растворы в лунках должны сменить цвет с голубого на

		желтый)
<b>2. Значения ОП выше 2,8 о.е.</b>	Избыток конъюгата	Проверьте расчеты, выполненные при разведении 50-кратного концентрата конъюгата (п. 6.2). Убедитесь, что полуавтоматические дозаторы отмеряют правильный объем
	Превышение температуры и продолжительности инкубации относительно значений, указанных в инструкции	Соблюдайте указанные в инструкции продолжительности стадий анализа. Выполняйте первую стадию анализа в течение 50 мин, вторую – в течение 15 мин при температуре (20 - 25) °С (п. 9.1.3 и 9.1.5). Сократите время проведения ферментативной реакции более ранним внесением стоп-реагента
	Неудовлетворительное промывание лунок	Обязательно выполняйте указанное в инструкции число промываний лунок (п. 9.1.4). Для приготовления рабочего раствора моющего буфера используйте дистиллированную или деионизованную воду надлежащего качества. В случае загрязнения приготовьте свежий раствор. При использовании промывочной машины, убедитесь в правильной ее работе
	Голубая окраска хромоген-субстратного раствора до его внесения в лунки	Замените хромоген-субстратный раствор аналогичным раствором этой же партии. При раскапывании раствора конъюгата и хромоген-субстратного раствора многоканальной полуавтоматической пипеткой необходимо использовать два разных лотка для каждого из реагентов.
<b>3. Высокий разброс значений ОП в парах лунок (коэффициент)</b>	Хромоген-субстратный раствор и стоп-реагент добавляются не одним и тем же образом	Добавляйте хромоген-субстратный раствор и стоп-реагент в лунки в одном и том же порядке и с одинаковыми скоростями, используя многоканальный дозатор

<b>вариации (КВ) &gt; 15 %</b>	Неточность пипетирования	Убедитесь, что дозаторы работают правильно и откалиброваны; при работе с дозатором руководствуйтесь инструкцией по его использованию
	Недостаточное перемешивание раствора конъюгата	Тщательно перемешайте раствор, полученный в результате разведения 50-кратного концентрата конъюгата раствором для разведения конъюгата (п. 6.2)
	Нижняя наружная поверхность микропланшета загрязнена	Перед внесением в лунки хромоген-субстратного раствора переверните планшет вверх дном и убедитесь в отсутствии капель, царапин, отпечатков пальцев и других загрязнений на дне лунок (внешняя поверхность). В случае обнаружения загрязнений аккуратно удалите их мягкой нетканой салфеткой
<b>4. Вид градуировочного графика не соответствует указанному в паспорте к тест-системе</b>	Неточность пипетирования	Убедитесь, что дозаторы работают правильно и откалиброваны; при работе с дозатором руководствуйтесь инструкцией по его использованию
	Неудовлетворительная промывка	Обязательно выполняйте указанное в инструкции число промываний лунок (п. 9.1.4). Для приготовления рабочего раствора моющего буфера используйте дистиллированную или деионизованную воду надлежащего качества. В случае загрязнения приготовьте свежий раствор. При использовании промывочной машины, убедитесь в правильности ее работы
	Градуировочные растворы внесены в неправильном порядке	Учтите порядок внесения градуировочных растворов при построении градуировочного графика. При необходимости выполните анализ еще раз соблюдая порядок внесения растворов