

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ХЛОРАМФЕНІКОЛУ В ПРОДУКТАХ
ХАРЧУВАННЯ

5126-8, Chloramphenicol

Каталог. №: 5126-8

Методика від 09-27-2010

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Чутливість	0.03 нг/мл
Відновлення (Насичені зразки)	90-115 %
Загальний час	60 хвилин

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Кількісний тест DAI Хлорамфенікол заснований на принципі твердофазного імуоферментного аналізу. Мікропланшет покритий антитілами, які зв'язані білками. Стандарти та зразки, що містять Хлорамфенікол, та антитіла до Хлорамфеніколу додаються в лунки. Хлорамфенікол, що міститься у взірцях чи стандартах, буде зв'язуватись з антитілами, які реагують з протеїном, нанесеним в лунки. Після 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі кон'югат Хлорамфенікол-пероксидаза додається до лунок без попереднього етапу промивання для насичення вільними антитілами зв'язуючих сайтів. Після додаткових 15 хвилин інкубації при кімнатній температурі лунки промивають розведеним миючим розчином для видалення незв'язаного матеріалу. Додають розчин субстрату і інкубують протягом 15 хвилин, в результаті відбувається розвиток синього кольору. Розвиток кольору перешкоджається додаванням стоп-розчину, а колір змінюється на жовтий. Жовтий колір вимірюється фотометрично при 450 нм. Концентрація Хлорамфеніколу обернено пропорційна інтенсивності кольору зразка.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Повна відповідність наступним принципам належної лабораторної практики (GLP) визначатиме достовірність результатів:

1. Перед початком процедури аналізу доведіть все реагенти до кімнатної температури (20-25 °C).
2. Всі реагенти повинні бути змішані шляхом обережного перевертання або прокручування перед використанням. Не приводити до утворення піни.
3. Після того, як аналіз був запущений, всі наступні кроки мають бути завершені без перерви і в межах рекомендованих термінів.
4. Закрити кришками всі реагенти відразу ж після використання. Не міняйте пробки на флаконах.
5. Використовуйте окремий одноразовий наконечник для кожного зразка, щоб запобігти перехресного забруднення.
6. Всі зразки і стандарти мають бути запущені одночасно, так, щоб всі умови випробувань були однаковими.
7. Не змішуйте компоненти з різних партій.
8. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
9. Перевірте як точність, так і достовірність лабораторного обладнання, що використовується під час процедури (мікропіпетки, ІФА читач і т.д.).

ІНСТРУКЦІЇ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

1. Не паліть, не їжте, не пийте і не піпетуйте ротом в лабораторії.
2. Використовуйте одноразові рукавички при роботі із зразками пацієнтів.
3. Уникайте контакту субстрату і стоп-розчину зі шкірою і слизовою оболонкою (можливе подразнення, опіки або токсична небезпека). У разі контакту, промийте уражену зону з великою кількістю води.
4. Робота та утилізація хімічних продуктів має проводитись відповідно до принципів роботи належної лабораторної практики (GLP).

РЕАГЕНТИ

Набір містить реагенти для 96 визначень. Вони повинні зберігатися при температурі 2-8 °C. Дані експірації знаходяться на етикетках пляшок і зовнішній упаковці.

1. Мікропланшет, що складається з 12 смужок по 8 лунок кожна, покритий антитілами, зв'язаними з протеїном.
2. Стандарти Хлорамфеніколу (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 нг/мл): 6 флаконів 1.0 мл кожен, червоного кольору, готові до використання.
3. Антитіло анти-Хлорамфенікол (вівця): 6 мл, червоного кольору, готовий до використання.
4. Кон'югат (Хлорамфенікол-пероксидаза): 6 мл, червоного кольору, готовий до використання.
5. Розчин субстрату (ТМБ): 15 мл; попередньо пофарбований червоний, готовий до використання.
6. Стоп розчин (0.5 M H₂SO₄): 15 мл; готовий до використання.
7. Розчин для розведення зразків (PBS): 2x60 мл, червоного кольору, готовий до використання.
8. Промивний Розчин (PBS + Твін 20): 60 мл, як 10x концентрату, синього кольору. Розвести 1+9 дистильованою водою. Якщо протягом зберігання в холоді утворилися кристали, концентрат необхідно нагріти до 37 °C протягом 15 хвилин.
9. Дві пластикові плівки для покриття смужок під час інкубації.
10. Пластиковий пакет для зберігання невикористаних смужок.
11. Керівництво по експлуатації.

ДОДАТКОВІ ІНСТРУМЕНТИ І РЕАКТИВИ (НЕ ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ)

Вимірювальні прилади

- Мікропіпетки на 50, 100, 500 і 1000 мкл
- Пляншетний зчитувач (450 нм)
- Центрифуга
- Ultra-Turrax, змішувач
- Випарник

Реагенти

- Двічі дистильована вода
- Етилацетат
- N-Гексан
- Potassium hexacyanoferrate (II)-3-гідрат (150 г/л; Carrez I)
- Zincsulfate-7-водний гідрат (300 г/л; Carrez II)

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Молоко (прямий аналіз)

- Охолодити зразки свіжого молока при 2-8 °C і центрифугувати при 3000g протягом 10 хвилин.
- Зняти верхній шар жиру і протестувати зразок безпосередньо в ELISA після нагрівання до кімнатної температури. Для знежирених проб молока центрифугування може бути пропущено.
- Коефіцієнт розведення зразка: F = 1

Молоко (Екстракція Етилового ацетату)

- Додати 250 мкл Carrez I до 5 мл зразка молока, добре перемішати і додати 250 мкл Carrez II.
- Зразок перемішати, охолодити до 2-8 °C і центрифугувати при 3000g протягом 10 хвилин.
- Перемістити 4.4 мл прозорого супернатанта в чисту скляну пробірку, додати 8 мл етилацетату і перемішати енергійно протягом 10 хвилин.
- Для розділення фаз центрифугувати протягом 10 хвилин при 3000g (кімнатна температура).
- Перемістити 4 мл верхньої фази етилацетату в чисту скляну пробірку і випарити розчинник при 50-70 °C в струмі азоту до сухого.
- Розчинити сухий залишок в 400 мкл Розчинника для зразка при енергійному струшуванні і протестувати зразок з ELISA.
- Коефіцієнт розведення зразка: F = 0.2

Мед

- Розчинити 2 г меду в 4 мл двічі дистильованої води.
- Додати 4 мл етилацетату і перемішати енергійно протягом 10 хвилин.
- Перемістити 1 мл верхньої фази етилацетату в чисту скляну пробірку і випарити розчинник при 50-70 °C в струмі азоту до сухого.
- Розчинити сухий залишок з 500 мкл Розчинника для зразка при енергійному струшуванні і протестувати зразок з ELISA.
- Коефіцієнт розведення зразка: F = 1

Креветки, м'ясо, рибні страви

- Перемолоти і гомогенізувати зразок у відповідному пристрої (змішувач, Ultra-Turrax).

- Перемішати 3 г зразка з 3 мл двічі дистильованої води додати, додати 6 мл етилацетату і перемішати енергійно протягом 10 хвилин.
- Для розділення фаз центрифугувати протягом 10 хвилин при 3000g (кімнатна температура).
- Перемістити 4 мл верхньої фази етилацетату в чисту скляну пробірку і випарити розчинник при 50-70 °C в струмі азоту насухо.
- Додати 1 мл N-Гексан до залишку.
- Додати 500 мкл Розчинника для зразків до суміші і перемішати енергійно протягом 1 хвилини.
- Для розділення фаз центрифугувати протягом 10 хвилин при 3000g (кімнатна температура).
- Тестувати нижню, водну фазу з ELISA.
- Коефіцієнт розведення зразка: F = 0.25

Яйце (cupe)

- Гомогенізувати зразок у відповідному пристрої (змішувач, Ultra-Turrax).
- До 2 г зразка додати 12 мл етилацетату і перемішати енергійно протягом 10 хвилин.
- Для розділення фаз центрифугувати протягом 10 хвилин при 3000g (кімнатна температура).
- Перемістити 6 мл верхньої фази етилацетату в чисту скляну пробірку і випарити розчинник при 50-70 °C в струмі азоту насухо.
- Додати 1 мл N-Гексан до залишку.
- Додати 1 мл Розчинника для зразків до суміші і перемішати енергійно протягом 1 хвилини.
- Для розділення фаз центрифугувати протягом 10 хвилин при 3000g (кімнатна температура).
- Тестувати нижню, водну фазу з ELISA.
- Коефіцієнт розведення зразка: F = 1

ПРОЦЕДУРА

1. Підготувати зразки, як описано вище.
2. Внести 100 мкл стандартів або підготовлених зразків в двох примірниках у відповідні лунки планшета. Відразу додати 50 мкл антитіл анти-Хлорамфеніколу в кожну лунку.
3. Накрити планшет з пластиковою плівкою і інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
4. Без попереднього промивання додати 50 мкл кон'югату Хлорамфенікол-пероксидаза в кожну лунку.
5. Накрити планшет з пластиковою плівкою і інкубувати ще 15 хвилин при кімнатній температурі.
6. Промити пластини три рази таким чином: Піпетувати 300 мкл розведеного миючого розчину в кожну лунку. Видалити вміст лунок, перевернувши планшет і постукати ним по паперовому рушнику. Повторіть описану вище процедуру три рази. Процедура промивання є критичною. Недостатня промивка призводить до низької точності і завищеним значенням абсорбції.
7. Внести 100 мкл розчину субстрату в кожну лунку.
8. Залишити в темряві (наприклад, шафа або ящик; хромоген є світлочутливим) протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.
9. Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину (0.5M H₂SO₄) у кожну лунку. Синій колір змінюється на жовтий при додаванні.
10. Після ретельного перемішування виміряти поглинання при 450 нм (референтна довжина хвилі 620 нм), використовуючи ІФА-рідер. Забарвлення залишається стабільним протягом 30 хвилин.

ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Розрахувати середнє значення оптичної щільності (OD 450 нм) для кожного набору стандартів або зразків.
2. Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню оптичну щільність, отриману для кожного стандарту, проти його концентрації в нг/мл на напівлогарифмічному міліметровому папері з оптичною щільністю на вертикальній (Y) вісі і концентрацією на горизонтальній (X) вісі.
3. Використовуючи середнє значення оптичної щільності для кожного зразка, визначити відповідну концентрацію Хлорамфеніколу в нг/мл за стандартною кривою. Залежно від досвіду і/або можливостей комп'ютера, можуть бути використані інші методи обробки даних.
4. Розведені зразки повинні бути надалі перетворені з використанням відповідного коефіцієнта розведення. Коефіцієнти перераховані для кожного зразка матриці у підготовці розділу зразка.

Примітка: У зв'язку з екстракцією етилацетатом негативні зразки можуть показати певне пусте значення. У повторюваних

проведених експериментах з негативними зразками для кожної матриці були визначені наступні значення Бланк.

Молоко (прямий аналіз)	< 0.1 нг/г
Молоко (Екстракція з Етилацетатом)	< 0.1 нг/г
Мед	< 0.2 нг/г
Креветки	< 0.2 нг/г
М'ясо	< 0.2 нг/г
Рибні страви	< 0.2 нг/г
Яйце	< 0.05 нг/г

Ці значення визначаються як Значення Cut-off методу для відповідних матриць. Більш низькі концентрації повинні розглядатися як негативні.

ТИПОВІ СТАНДАРТНІ ЗНАЧЕННЯ

У наступній таблиці наведено приклад для типової калібрувальної кривої. Зв'язування розраховують як відсоток поглинання стандарту 0 нг/мл. Ці значення є лише прикладом і не повинні використовуватись замість стандартної кривої, яка повинна бути виміряна в кожному новому випробуванні.

Хлорамфенікол (нг/мл)	(% зв'язування 0 нг/мл)
0	100
0.05	84
0.1	70
0.5	28
1	17
5	8

РОБОТА АНАЛІЗУ

Чутливість

Чутливість DA1 Афлатоксин M1 ELISA складає 0.03 нг/мл (на основі стандартної кривої).

Відновлення

Молоко (прямий аналіз)	94 %
Молоко (Екстракція з Етилацетатом)	98 %
Мед	98 %
Креветки	96 %
М'ясо	108 %
Рибні страви	90 %
Яйце	95 %

Внутрішньосерійна Точність

Внутрішньосерійна Точність складає 8 %.

Передресна реактивність по відношенню до Хлорамфеніколу (= 100%)

Chloramphenicol Base	< 0.1%
Ampicillin	< 0.1%
Penicillin	< 0.1%
Tetracycline	< 0.1%



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com