

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения содержания микотоксина зеараленона в зерновых, зернобобовых и масличных культурах и продуктах их переработки методом иммуноферментного анализа «ИФА микотоксин-зеараленон», формы выпуска 1 и 2
ТУ ВУ 193208315.039-2022

ВНИМАНИЕ!

Изучите инструкцию перед
началом работы



ООО «Альгимед Техно»
Республика Беларусь,
г. Минск, тр. Логойский, д.22,
корп.1, ком. 309

techno@algimed.com

+375 29 893 14 44

www.algimed-techno.com

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор предназначен для количественного определения содержания микотоксина зеараленона методом конкурентного иммуноферментного анализа в следующих матрицах:

- зерновые (пшеница, рожь, овес, тритикале, ячмень, просо, солод, гречиха, рис, кукуруза и т.п);
- зернобобовые культуры (горох, фасоль, чечевица, нут и т.п)
- масличные культуры (соя, рапс, подсолнечник, лен)
- продукты переработки зерновых и зернобобовых культур (мука, мучные и хлебобулочные изделия, крупы и т.п.);
- продукты масложировой промышленности (жмых, шрот);
- корма для животных на зерновой и зернобобовой основе;
- пиво.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Наборы в форме выпуска 1 рассчитаны на проведение измерений 48 образцов, включая градуировочные растворы. Наборы в форме выпуска 2 рассчитаны на проведение измерений 96 образцов, включая градуировочные растворы.

2.2 Состав набора

Компонент набора	Форма выпуска 1	Форма выпуска 2	Хранение
Иммуносорбент (разборный микропланшет с иммобилизованными антителами к зеараленону)	6 стрипов по 8 лунок	12 стрипов по 8 лунок	2-8 °C
Градуировочные растворы зеараленона с концентрацией 0 нг/см ³ , 25 нг/см ³ , 50 нг/см ³ , 200 нг/см ³ , 500 нг/см ³ .	5×0,5 мл	5×1,0 мл	2-8 °C
Конъюгат	1×6 мл	1×12 мл	2-8 °C
20-ти кратный концентрат промывочного раствора*	1×15 мл	1×30 мл	2-8 °C
Стоп-реагент*	1×6 мл	1×12 мл	2-8 °C
ТМБ-субстрат*	1×6 мл	1×12 мл	2-8 °C
Буфер для разведения проб	1×15 мл	1×30 мл	2-8 °C

*Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера серии в наборах реагентов производства ООО «Альгимед Техно».

2.2 Пределы обнаружения зеараленона

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг (мкг/л)
зерновые (пшеница, рожь, овес, тритикале, ячмень, просо, солод, гречиха, рис, кукуруза и т.п), зернобобовые (горох, фасоль, чечевица, нут и т.п), масличные культуры (соя, рапс, подсолнечник, лен), продукты переработки зерновых и зернобобовых культур (мука, мучные и хлебобулочные изделия, крупы и т.п.), продукты масложировой промышленности (жмых, шрот), корма для животных на зерновой и зернобобовой основе	25-500
пиво	25-500

3 ПРИНЦИП МЕТОДА

Используемый метод основан на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого антителами к зеараленону, вместе с раствором пробы или градуировочным раствором добавляют конъюгат (зеараленон, конъюгированный с пероксидазой хрена). Присутствующий в пробе зеараленон конкурирует с конъюгированным с пероксидазой зеараленон за связывание с антителами на стенках лунки планшета. Интенсивность окраски, образующейся после добавления ТМБ-субстрата, обратно пропорциональна



концентрации зеараленона в растворе. Оптическая плотность растворов измеряется при 450 нм. Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации зеараленона в градуировочном растворе или в растворе пробы. Массовая концентрация зеараленона в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 5 градуировочных растворов.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1 При работе с набором следует соблюдать общие правила работы в химико-аналитической лаборатории.

4.2 Градуировочные растворы содержат зеараленон, при работе с ним следует избегать контакта с кожей использовать средства индивидуальной защиты (перчатки). При попадании градуировочного раствора на кожу или слизистые оболочки немедленно промыть большим количеством воды.

4.3 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

5 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

5.1 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе моющего средства промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой два раза и высушивают. Запрещается многократное использование одноразовой лабораторной посуды.

5.2 Условия выполнения измерений и инкубации планшетов

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С; относительная влажность воздуха не более 80%;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет, микропланшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, рекомендуется помещать под него теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце;
- при низкой относительной влажности воздуха и наличии воздушных потоков с целью устранения возможности испарения содержимого лунок рекомендуется покрывать планшет пленкой «парафильм»;
- в особых случаях, которые оговорены по тексту инструкции, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например, в ящик стола.

6 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1 Оборудование

- Весы лабораторные;
- Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм;
- Центрифуга лабораторная;
- Лабораторный вортекс или шейкер;
- Холодильник бытовой;
- Дозаторы одноканальные объемом дозирования 50-200, 100-1000 мкл;
- Дозатор восьмиканальный объемом дозирования 50-350 мкл.

Опционально:

- Инкубатор для микропланшетов;
- Автоматическое устройство для промывания иммунологических планшетов.

6.2 Реактивы, не входящие в состав набора

- Вода дистиллированная или вода деионизированная;
- Метанол



7 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

7.1 Отбор образцов

Отбор образцов проводят по СТБ 1036 или другому принятому нормативному документу, регламентирующему отбор образцов. Отобранные образцы могут храниться в бумажных или полотняных пакетах в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 25 °С и влажности не более 80% в течение трех недель или в замороженном виде при температуре не выше минус 10 °С в течение 6 месяцев. Отобранные образцы пива хранят в плотно укупороженных пластиковых или стеклянных емкостях в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение трех недель или в замороженном виде при температуре не выше минус 10 °С в течение 6 месяцев. Перед проведением подготовки проб замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от 2° С до 8° С.

7.2 Приготовление 70 % раствора метанола

С помощью мерного цилиндра отмеряют 70 см³ метанола и 30 см³ дистиллированной или деионизованной воды. Переливают в колбу объемом 100 см³ и перемешивают. Приготовленный раствор может храниться в плотно закрытой емкости при комнатной температуре в течение трех месяцев.

7.3 Приготовление буфера для разведения проб пива

К отмеренному с помощью мерного цилиндра или полуавтоматической пипетки объему буфера для разведения проб приливают равный объем 70% раствора метанола. Тщательно перемешивают. Приготовленный раствор готовят непосредственно перед использованием и хранению он не подлежит.

8 ПОДГОТОВКА ПРОБ

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от +20 °С до +25 °С в течение часа.

8.1 Подготовка проб зерновых (пшеница, рожь, овес, тритикале, ячмень, просо, солод, гречиха, рис, кукуруза и т.п), зернобобовых (горох, фасоль, чечевица, нут и т.п), масличных культур (соя, рапс, подсолнечник, лен), продуктов переработки зерновых и зернобобовых культур (мука, мучные и хлебобулочные изделия, крупы и т.п.), продуктов масложировой промышленности (жмых, шрот), кормов для животных на зерновой и зернобобовой основе.

- Исследуемый образец массой 100 – 150 г измельчают в блендере или гомогенизаторе в течение 3 – 5 минут.

- Навеску образца массой 5,00 ± 0,01 г помещают в центрифужные пробирки объемом 50 см³ и с помощью мерного цилиндра добавляют 25 см³ 70% раствора метанола, приготовленного по п. 7.2.

- Экстрагируют пробу в течение 5 минут при перемешивании на шейкере (200-400 об./мин) или встряхивая вручную.

- Центрифугируют при 20 - 25 °С, 3000 g, 5 мин. При отсутствии центрифуги надосадочную жидкость фильтруют с помощью бумажного фильтра в чистую колбу объемом 25 - 100 см³.

- Отбирают 200 мкл надосадочной жидкости (фильтрата) и переносят в пробирки объемом 1,5 – 2 мл. Добавляют 200 мкл буфера для разведения проб, и перемешивают на вортексе в течение 1 мин на максимальной скорости.

Полученные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от +20 °С до +25 °С в течение часа.

8.2 Подготовка проб пива.

- Исследуемый образец пива при необходимости дегазируют нагреванием при температуре 35-40 °С в течение 30 мин и центрифугируют при 20 - 25 °С, 3000 g, 5 мин.

- Отбирают надосадочную жидкость объемом 100 мкл и переносят в пробирки объемом 1,5 – 2 мл. Добавляют 900 мкл буфера для разведения проб пива,



приготовленного по п. 7.3, и перемешивают на вортексе в течение 1 мин на максимальной скорости.

Полученные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от +20°C до +25° в течение часа.

9 ПОДГОТОВКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

9.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника выдерживают при температуре от +20 °C до +25 °C в течение 30 минут.

При работе необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты набора реагентов.

Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать обратно в оригинальные флаконы остатки реагентов, используемых при проведении измерений.

9.2 Подготовка иммуносорбента

Микропланшет со стрипами вынимают из упаковки. В рамку микропланшета помещают необходимое для проведения измерений количество стрипов (лунок). Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят при температуре от +2 °C до +8 °C.

При использовании набора реагентов «ИФА микотоксин - зеараленон» допускается в ходе проведения измерений выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно. Для этого внесение раствора конъюгата по п. 9.2, ТМБ-субстрата по п. 9.5, стоп-реагента по п. 9.7, проводят с использованием многоканального дозатора. Отбор указанных выше реагентов многоканальным дозатором производят из предварительно наполненных отбираемым раствором одноразовых ванночек для реагентов.

При этом не допускается:

- ✓ выливать реагент из одноразовой ванночки обратно во флакон;
- ✓ использовать одноразовую ванночку повторно.

9.3 Приготовление промывочного раствора

Аликвоту 20-ти кратного концентрата промывочного раствора, отмеренную мерным цилиндром, переносят в коническую колбу, приливают отмеренную мерным цилиндром дистиллированную воду, объем которой в 19 раз больше объема аликвоты концентрата, и перемешивают. Полученный раствор хранят при температуре от +2 °C до +8 °C не более 6 недель в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

10 ПРОВЕДЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

10.1 Вносят по 50 мкл каждого градуировочного раствора и каждого исследуемого образца в две параллельные лунки. Внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов.

10.2 Вносят 100 мкл конъюгата, и аккуратно круговыми движениями микропланшета по поверхности стола. перемешивают содержимое лунок.

10.3 Инкубируют планшет при температуре от +20 °C до +25 °C в течение 10 мин.

10.4 Выливают содержимое лунок путем резкого переворачивания рамки планшета. Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки по 250 мкл промывочного раствора, оставляя на 15 секунд и затем выливая его резким переворачиванием планшета. Повторяют стадию промывки еще дважды. Выполняют следующий этап сразу после промывания планшета. Не допускается высыхание планшета на воздухе в перерывах между этапами работы.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов (вошера), задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – три, объем заливаемого моющего раствора – 250 мкл, время замачивания – 15 секунд. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого сухим листом фильтровальной бумаги.



10.5 Вносят 100 мкл ТМВ-субстрата, после чего сразу же засекают время начала инкубации. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола.

Не допускается выливать обратно в оригинальный флакон остатки ТМВ-субстрата во избежание его контаминации.

10.6 Помещают планшет в инкубатор при температуре от +20 °С до +25 °С и инкубируют в течение 10 мин. При отсутствии инкубатора микропланшет инкубируют в помещении в защищенном от света месте.

10.7 Сразу же после окончания времени инкубации в каждую лунку вносят по 100 мкл стоп-реагента и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

10.8 Протирают микрофибровой салфеткой нижнюю наружную поверхность лунок и измеряют оптическую плотность раствора в лунках с помощью автоматического фотометра при длине волны 450 нм. Измерение необходимо провести не позднее 5 минут после добавления стоп-реагента.

11 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ

11.1 Расчет массовой концентрации зеараленона

Шаблон для обработки результатов измерений средствами Microsoft® Office Excel «Шаблон ИФА микотоксин - зеараленон», разработанный ООО «Альгимед Техно», производит автоматическую обработку результатов измерений оптической плотностей градуировочных растворов и проб.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1 Набор транспортируется всеми видами крытого транспорта при температуре 2-8 °С.

12.2 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом и темном помещении при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

12.3 Замораживать набор запрещается.

12.4 Срок годности набора - 18 месяцев.

12.5 После вскрытия набора все реагенты стабильны в течение всего срока годности набора при соблюдении условий хранения и требований инструкции по применению.

13 ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

Общество с ограниченной ответственностью «Альгимед Техно»
220090 Республика Беларусь, г. Минск, Логойский тракт, 22/1, комната 309.

Тел. + 375 29 893 14 44

Отдел контроля качества:

Тел. + 375 (29) 101-27-68 (Telegram, Viber)

techno@algimed.com

www.algimed-techno.com

14 ОФИЦИАЛЬНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Общество с ограниченной ответственностью «Альгимед»
121596, Российская Федерация, г. Москва, ул. Говорова

д. 16, корпус 6, этаж 1, комн. 7, 14

Тел. +7 499 682 61 09

