

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор



Л.Е. Бату́ро

«13» сентября 2019 г.

ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.

**Методика измерений содержания стрептомицина методом ИФА
с использованием набора реагентов MaxSignal Streptomycin ELISA Test Kit и
ИФА антибиотик-стрептомицин**

МИ 1014-2019 (МВИ.МН 4894-2018)

(Взамен МИ 1014-2018 (МВИ.МН 4894-2014))

**Москва
2019**

ПРЕДИСЛОВИЕ

1 РАЗРАБОТАНА Обществом с ограниченной ответственностью «Альгимед»» (ООО «Альгимед») «26» августа 2019 г.

2 АТТЕСТОВАНА Федеральным бюджетным учреждением «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в г. Москве» (ФБУ «Ростест-Москва») «03» сентября 2019 г.

3 УТВЕРЖДЕНА «03» сентября 2019 г. приказом Генерального директора ООО «Альгимед»

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ от «03» сентября 2019 г. № 6350/130-RA.RU.311703-2019 выдано ФБУ «Ростест-Москва»

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ ФР.1.31.2019.35187

СОДЕРЖАНИЕ

1	ВВОДНАЯ ЧАСТЬ	6
1.1	Назначение и область применения методики измерений	6
2	НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	6
3	ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ	7
4	ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ УСТРОЙСТВАМ, МАТЕРИАЛАМ, РЕАКТИВАМ	10
5	МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ	14
6	ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ.....	14
6.1	Общие требования безопасности.....	14
6.2	Требования к квалификации операторов	14
7	УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ	15
7.1	Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении	15
7.2	Условия хранения набора реагентов	15
8	ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ	16
8.1	Отбор образцов	16
8.2	Подготовка лабораторной посуды.....	16
8.3	Приготовление растворов.....	16
8.3.1	Растворы, используемые при работе с наборами реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» и «ИФА антибиотик-стрептомицин»	16
8.3.2	Растворы, используемые при работе с наборами реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина».....	16
8.3.3	Растворы, используемые при работе с наборами реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»	17
8.4	Подготовка набора реагентов	19
8.4.1	Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов.....	19
8.4.2	Подготовка микротитровального планшета	19
8.4.3	Приготовление промывочного раствора	20
8.4.4	Приготовление конъюгата антител с пероксидазой № 2 (при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»)	20
8.5	Подготовка проб.....	21
8.5.1	Подготовка проб при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина».....	21

8.5.2 Подготовка проб при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»	24
9 ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ	31
9.1 Общие требования	31
9.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа	31
9.2.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб	31
9.2.2 Добавление антител	32
9.2.3 Инкубация планшета	32
9.2.4 Промывка планшета	32
9.2.5 Добавление конъюгата	32
9.2.6 Инкубация планшета	33
9.2.7 Промывка планшета	33
9.2.8 Добавление ТМВ-субстрата	33
9.2.9 Инкубация планшета	33
9.2.10 Завершение реакции окрашивания	33
9.2.11 Измерение оптической плотности	33
10 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	34
10.1 Расчет массовой концентрации	34
10.2 Определение массовой концентрации стрептомицина при получении результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки	35
10.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	36
11 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	36
11.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности	36
11.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки концентрации стрептомицина с использованием предела измерения	37
11.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации стрептомицина с использованием значения верхней границы диапазона измерений	37
12 КОНТРОЛЬ ТОЧНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	37
12.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости	37
12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	38

12.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.....	38
12.4 Контроль правильности	40
12.4.1 Образцы контроля, представляющие собой рабочие пробы с добавкой	40
12.4.2 Проведение контрольной процедуры	40
12.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК).....	41
12.5.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости	42
12.5.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности.....	43
БИБЛИОГРАФИЯ.....	44

1 ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Назначение и область применения методики измерений

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации стрептомицина с использованием набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» («MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit», производства Perkin&Elmer (США), или набора реагентов «ИФА Антибиотик-стрептомицин», производство ООО «Компания Альгимед» (Республика Беларусь), далее набор реагентов.

Настоящая методика распространяется на:

Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, сухую молочную сыворотку, масло сливочное, сыр, творог, молочную сыворотку, йогурт, кефир, сметану при использовании обоих вышеуказанных наборов реагентов;

Коктейли на молочной основе, мороженое, сгущенное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, яйца, мед, мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты (печень, почки), консервы мясные и мясорастительные, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, при использовании только набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин».

2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей методике использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 24104–2001 «Весы лабораторные. Общие технические требования»

ГОСТ 6709–72 «Вода дистиллированная. Технические условия»

ГОСТ 12.1.004–91 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования»

ГОСТ 12.2.003–91 «Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности»

ГОСТ 12026–76 «Бумага фильтровальная лабораторная. Общие технические требования»

ГОСТ 1770–74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия»

ГОСТ 25336–82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры»

ГОСТ 25336–82 Е «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры»

ГОСТ 28498–90 «Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний»

ГОСТ 29169–91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой»

ГОСТ 29227–91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования»

ГОСТ 8.010–99 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения»

СТБ 1036–97 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности»

СТБ ИСО 5725–6–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике»

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящей методикой измерений целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по действующему «Указателю национальных стандартов» и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящей рекомендацией следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Диапазоны измерения методики указаны в таблице 1.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

В результате оценки показателя правильности при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» установлена статистическая значимость смещения для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого и масла сливочного, которая была учтена при оценивании неопределенности. Для остальных видов продукции при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» и для всех видов продукции при использовании наборов реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин» была установлена незначимость смещения во всем диапазоне измерений.

Значения оценок относительных значений показателей повторяемости и промежуточной прецизионности и относительной расширенной неопределенности приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности

Набор реагентов	Диапазон измерений, мкг/кг		Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit	от 5,0 до 250,0 включительно		3,4	8,5
ИФА Антибиотик - стрептомицин	Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 5,0 до 375 включительно	5,9	7,9
	Йогурт, кефир, сметана, сухая молочная сыворотка, молочная сыворотка, коктейли на молочной основе, мороженое, творог, масло сливочное, сыр	от 7,50 до 375 включительно		
	Жир, сало, в т.ч. шпик, субпродукты (почки)	от 10,0 до 1200 включительно		
	Сгущенное молоко, мед	от 20,0 до 600 включительно	2,3	7,7
	Мясо, мясные продукты, яйца, субпродукты (печень), консервы мясные и мясорастительные	от 10,0 до 1200 включительно		

Таблица 2 – Значения оценок неопределенности

Набор реагентов	Диапазон измерений, мкг/кг		Относительная суммарная стандартная неопределенность U_c , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K=2$, $P=95$ %
MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit	от 5,0 до 250,0 включительно		11	22
ИФА Антибиотик - стрептомицин	Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 5,0 до 375 включительно	11	22
	Йогурт, кефир, сметана, сухая молочная сыворотка, молочная сыворотка, коктейли на молочной основе, мороженое, творог, масло сливочное, сыр	от 7,50 до 375 включительно		
	Жир, сало, в т.ч. шпик, субпродукты (почки)	от 10,0 до 1200 включительно		
	Сгущенное молоко, мед	от 20,0 до 600 включительно	10	20
	Мясо, мясные продукты, яйца, субпродукты (печень), консервы мясные и мясорастительные	от 10,0 до 1200 включительно		

Значения оценок неопределенности, указанные в таблице 2 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2;
- показатели правильности – [1];
- оценки неопределенности – [1], [2].

4 ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ УСТРОЙСТВАМ, МАТЕРИАЛАМ, РЕАКТИВАМ

При проведении измерений применяются следующие средства измерений:

- весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г, допускаемой погрешностью $\pm 0,01$ г;
- автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более ± 5 %), например, iMark Microplate Absorbance Reader, производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США.4;
- шаблон «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанный BIOO Scientific Corporation, версия не ниже 1,0 (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»), шаблон на базе Microsoft Office Excel «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-стрептомицин», разработанное ООО «Компания Альгимед», версия не ниже 1.0 (при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»);
- термометр лабораторный частичного погружения класса точности 1 с ценой деления 1 °С по ГОСТ 28498;
- секундомер;
- центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (пробирки вместимостью 1,5 – 2 см³ и 15 см³), и охлаждением до температуры 10 °С, например, 1236R, производства LaboGene Aps, Дания;
- холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 18 °С в морозильной камере;
- лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин, например, MSV-3500, производства BioSan Ltd, Латвия;
- лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин;
- лабораторный ротатор, обеспечивающий скорость до 60 об/мин;

– гомогенизатор лабораторный типа TissueRuptor производства QIAGEN Group (Германия) или бытовой блендер;

– баня водяная или термостат (сушильный шкаф), обеспечивающие поддержание температур $(52 \pm 2) ^\circ\text{C}$, $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$, $(75 \pm 5) ^\circ\text{C}$;

– дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников, например, Acura manual 825, Acura manual 835, Acura manual 855 производства Socorex ISBA S.A., Швейцария:

– с диапазоном объемов дозирования от 10 до 100 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,5 \%$;

– с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5 \%$;

– с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 см³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0 \%$;

– многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5 \%$.

– колбы мерные вместимостью 50 см³ 2-50-2 по ГОСТ 1770;

– цилиндры мерные вместимостью 25 см³, 100 см³ типа 3-25-2, 3-100-2 по ГОСТ 1770.

Использование следующего оборудования не является обязательным, но рекомендуется для увеличения производительности и повышения точности измерений:

– инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 до плюс 25 $^\circ\text{C}$ с точностью $\pm 1 ^\circ\text{C}$, например, PST-60HL производства BioSan Ltd, Латвия;

– устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микроювету от 100 до 350 мм³, например, ELx 50/8, производства BioTek Instruments, Inc., США.

– пленка «парафильм» или скотч;

– микрофибровые салфетки для очистки оптических поверхностей;

Вспомогательное оборудование, реактивы и материалы:

– бумага фильтровальная по ГОСТ 12026;

– шпатели пластиковые;

– штатив для пробирок;

– пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 см³, 50 см³;

– пробирки для центрифугирования с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 2 см³ или аналоги;

- пробирки стеклянные вместимостью от 1 до 5 см³ типа П-1-5-0,1 ХС, 10 см³ типа П-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770;
- колбы конические вместимостью 100 см³, 250 см³, 500 см³ типа Кн—2—100—14/23 ХС, Кн-2-250-14/23 ХС, Кн-2-500-29/32 ХС по ГОСТ 25336;
- воронки типа В-56-80 ХС, В-75-110 ХС по ГОСТ 25336;
- стаканы Н-1-100 или Н-1-150 по ГОСТ 25336;
- вода, дистиллированная по ГОСТ 6709;
- Твин-20 (полисорбат-20), например, твин-20, каталожный номер Р9416, производства SIGMA;
- лабораторный детергент, например, Triton X-100;
- набор реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина», («MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit», Reference #1014-01B) производства Perkin&Elmer (США) — набор реактивов и микротитровальный планшет, или набор реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин» по [4], каталожный номер С004-01, производство ООО «Альгимед Трейд» необходимые для выполнения измерений по определению концентрации стрептомицина методом иммуноферментного анализа в составе (таблицы 3, 4).

Таблица 3 – Состав набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых стрептомицином)	1 шт.
Градуировочные растворы стрептомицина с концентрацией 0 нг/см, 0,5 нг/см ³ , 1,0 нг/см ³ , 2,50 нг/см ³ , 5,0 нг/см ³ , 10,0 нг/см ³	6 x 0,8 см ³
Антитела к стрептомицину № 1	12 см ³
HRP-конъюгат антител № 2 (100 x концентрат)	0,25 см ³
Растворитель для антител № 2	20 см ³
Экстракционный буфер для образцов (200x концентрат)	25 см ³
Промывочный раствор (20 x концентрат)	28 см ³
Стоп-реагент	14 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Буфер для доведения проб	0,5 см ³
PBS буфер(10x концентрат)	25 см ³
Реагент для очистки	12 см ³
Буфер для доведения проб № 1 (IX Balance Buffer)	28 см ³

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера в наборах реагентов производства BIOO Scientific Corporation:

- растворитель для антител № 2;
- концентрат экстракционного буфера для образцов;
- промывочный раствор;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат;
- Буфер для доведения проб;
- Концентрат PBS буфера.

Таблица 4 – Состав набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых стрептомицином)	1 шт.
Градуировочные растворы стрептомицина с концентрацией 0 нг/см, 0,5 нг/см ³ , 1,0 нг/см ³ , 2,50 нг/см ³ , 5,0 нг/см ³ , 15,0 нг/см ³	6 x 0,6 см ³
Антитела к стрептомицину №1	12 см ³
Конъюгат, готовый к применению	16 см ³
200х концентрат экстракционного буферного раствора	25 см ³
10х концентрат натрий-фосфатного буферного раствора	3 x 25 см ³
20х концентрат промывочного раствора	28 см ³
Стоп-реагент	12 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Буферный раствор для доведения проб	0,5 см ³
Экстракционный буферный раствор А	12 см ³
Экстракционный буферный раствор В	28 см ³

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера в наборах реагентов производства ООО «Альгимед Трейд»:

- 200х концентрат экстракционного буферного раствора;
- 10х концентрат натрий-фосфатного буферного раствора;
- 20х концентрат промывочного раствора;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат;
- Буферный раствор для доведения проб;

- Экстракционный буферный раствор А;
- Экстракционный буферный раствор В.

Допускается использовать другие средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование по метрологическим и техническим характеристикам, а материалы и реактивы (кроме набора реагентов) – по качеству не хуже указанных.

5 МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Используемый метод основан на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого стрептомицином, вместе с пробой или градуировочным раствором добавляют первичные антитела, специфичные к стрептомицину. Присутствующий в пробе стрептомицин конкурирует со стрептомицином, нанесенным на стенки лунок, за связывание с первичными антителами. После внесения вторичных антител, конъюгированных с ферментом пероксидазой, последние связываются с первичными антителами, связанными со стрептомицином на стенках лунки. После добавления субстрата, а затем стоп-реагента, измеряется оптическая плотность раствора при 450 нм. Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации стрептомицина в градуировочном растворе и стрептомицина в растворе пробы. Массовая концентрация стрептомицина в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

6 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ

6.1 Общие требования безопасности

При выполнении работ в соответствии с данной методикой персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;
- техники безопасности при работе в химической лаборатории в соответствии с инструкциями, утвержденными в установленном порядке;
- техники безопасности, изложенные в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений.

6.2 Требования к квалификации операторов

К проведению работ по данной методике допускаются лица, имеющие высшее специальное или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании,

освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа.

7 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 до плюс 25 °С;
- температура при приготовлении растворов (20 ± 2) °С;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С.

7.1 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

При отсутствии инкубатора микротитровальные планшеты могут инкубироваться в помещении при выполнении следующих условий.

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 до плюс 25 °С
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет 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 пленой «парафильм» или заклеивать скотчем;
- в особых случаях, которые оговорены по тексту методики измерений, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например, в ящик стола.

7.2 Условия хранения набора реагентов

Хранение набора реагентов осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке.

Микротитровальные планшеты должны храниться в плотно закрытой упаковке. Дополнительные рекомендации по хранению набора реагентов приведены в инструкции производителя.

8 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

8.1 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036, для проб молока и молочных продуктов - ГОСТ 26809.1, мяса по ГОСТ Р 51447 или аналогичному НД, установленному на предприятии. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 4 °С в течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 18 °С в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб по 8.5 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 до плюс 4 °С.

8.2 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе специализированного моющего средства промывают водопроводной, ополаскивают дистиллированной водой 2 раза и высушивают.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ:

- многократное использование одноразовой лабораторной посуды;
- использование бытовых моющих средств для мойки лабораторной посуды.

8.3 Приготовление растворов

8.3.1 Растворы, используемые при работе с наборами реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» и «ИФА антибиотик-стрептомицин»

8.3.1.1 Приготовление 1% раствора твин 20

В мерную колбу вместимостью 100 см³ дозатором помещают навеску твин-20 массой 1,00 г, взвешенную с точностью до 0,01 г, навеску растворяют в 20-25 см³ дистиллированной воды, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

1% раствор твин-20 хранят защищенными от действия света в плотно закрытой стеклянной посуде при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 3 месяцев.

Допускается использовать готовый 1 % раствор твин-20, который хранят в соответствии с инструкцией производителя.

8.3.2 Растворы, используемые при работе с наборами реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

8.3.2.1 Приготовление PBS-буфера

В коническую колбу вместимостью 100 см³ или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром

аликвоту 10× концентрата PBS-буфера, добавляют цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата PBS-буфера рассчитывают на основании количества анализируемых образцов по формуле (1)

$$V = \frac{6N_1 + V_1}{10}, \quad (1)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны;

V_1 – объем PBS-буфера, приготавливаемого в запас, см (не менее 1 см³). PBS-буфер приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

8.3.2.2 Приготовление PBS-буфера с твином

В коническую колбу вместимостью 100 см³ или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 10× концентрата PBS-буфера, добавляют цилиндром в 8 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают. Затем в колбу добавляют дозатором 1 % раствор твин-20, приготовленный по 8.3.1.1, объемом равный объему добавленной аликвоты концентрата, и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата PBS-буфера рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле (2)

$$V = \frac{0,8N_2 + 8N_3 + V_1}{10}, \quad (2)$$

где N_2 – количество анализируемых образцов молока;

N_3 – количество анализируемых образцов масла, сыра, творога;

V_1 – объем PBS-буфера с твином, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 1 см³).

PBS-буфер с твином приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

8.3.3 Растворы, используемые при работе с наборами реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»

8.3.3.1 Приготовление фосфатного буферного раствора

В коническую колбу вместимостью 100 или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 10× концентрата натрий-фосфатного буферного раствора, добавляют

мерным цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, 10× концентрата натрий-фосфатного буферного раствора рассчитывают на основании количества анализируемых образцов мяса, мясных продуктов, печени, консервов мясных и мясорастительных по следующей по формуле (3)

$$V = \frac{8,4 \cdot N_1 + V_1}{10}, \quad (3)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов мяса, мясных продуктов, печени, консервов мясных и мясорастительных, яиц;

V_1 – объем фосфатного буферного раствора, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 3 см³).

Фосфатный буферный раствор готовится непосредственно перед анализом и хранению не подлежит.

8.3.3.2 Приготовление фосфатного буферного раствора с твином

В коническую колбу вместимостью 100 или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 10× концентрата натрий-фосфатного буферного раствора, добавляют цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают. Затем в колбу добавляют дозатором 1 % раствор твин-20, приготовленный по 8.3.1.1, объемом в 4 раза меньшим по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата натрий-фосфатного буферного раствора, и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата натрий-фосфатного буферного раствора рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле (4)

$$V = \frac{0,8N_1 + 8N_2 + V_1}{10}, \quad (4)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов молока (сырого, пастеризованного, стерилизованного), сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, сгущенного молока;

N_2 – количество анализируемых образцов сливочного масла, сыра, творога;

V_1 – объем фосфатного буферного раствора с твином, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 3 см³).

Фосфатный буферный раствор с твином готовится непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

8.3.3.3 Приготовление экстракционного буферного раствора

В коническую колбу вместимостью 100 см³ приливают дозатором или цилиндром аликвоту 200× концентрата экстракционного буферного раствора, добавляют мерным цилиндром в 199 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата натрий-фосфатного буферного раствора рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле (5)

$$V = \frac{0,8N_1 + 8N_2 + V_1}{10}, \quad (5)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов субпродуктов (почек), сала, в т.ч. шпика, жиров животных;

N_2 – количество анализируемых образцов меда;

V_1 – объем экстракционного буферного раствора, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 5 см³).

Экстракционный буферный раствор готовится непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

8.4 Подготовка набора реагентов

8.4.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С от 1 до 2 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 до плюс 25 °С.

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

Растворы из набора реагентов следует готовить непосредственно перед проведением ИФА. Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать остатки реагентов обратно в оригинальные флаконы.

8.4.2 Подготовка микротитровального планшета

Количество лунок микротитровального планшета, необходимых для проведения измерений N_w , рассчитывается по формуле (6)

$$N_w = 12 + 2N_{SMP}, \quad (6)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные в соответствии с 8.4.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок N_w . Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 7.2.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят согласно схеме, предлагаемой шаблоном «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System» (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина») или шаблона на базе Microsoft Office Excel «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-стрептомицин» (при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин») с учетом выполнения по два параллельных измерения градуировочных растворов и образцов.

Не рекомендуется одновременно использовать более шести стрипов. Если необходимо провести измерение более 18 образцов, ИФА выполняется несколько раз.

8.4.3 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту $20 \times$ концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 14 см^3 приливают в коническую колбу вместимостью 250 или 500 см^3 и добавляют отмеренную мерным цилиндром вместимостью 25 или 100 см^3 (в зависимости от добавляемого объема) дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 19 раз больше, чем объем концентрата промывочного раствора. После перемешивания содержимое колбы переливают в емкость с закручивающейся пробкой. Если приготовленный объем раствора не превышает 50 см^3 , то для его приготовления и хранения могут использоваться пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см^3 . Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8°C не более одного месяца в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

8.4.4 Приготовление конъюгата антител с пероксидазой № 2 (при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»)

В стеклянную пробирку вместимостью 5 или 10 см^3 (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 объемом не менее 20 мм^3 , добавляют дозатором в 99 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем растворителя для антител № 2. Содержимое пробирки тщательно перемешивается путем вращения закрытой пробирки.

Объем используемой аликвоты V , см^3 , концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 рассчитывается на основании количества используемых лунок микротитровального планшета по формуле (7)

$$V = \frac{150N_w + V_1}{100}, \quad (7)$$

где N_w – количество лунок микротитровального планшета, используемых при проведении измерений, рассчитывается по 8.4.2;

V_i – объем конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготавливаемого в запас, мм³ (не менее 200 мм³).

Конъюгат антител с пероксидазой № 2 приготавливается непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

8.5 Подготовка проб

8.5.1 Подготовка проб при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

8.5.1.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Образец молока переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³ в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, и тщательно перемешивают на вортексе.

От образца молока с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробы в следующем режиме 4000 g, 5 мин. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм³ и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм³ PBS-буфера с твином, приготовленного по 8.3.2.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

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

8.5.1.2 Подготовка проб сухого молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца сухого молока отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки вместимостью 10 см³ и в каждую пробирку

добавляют отмеренные с помощью дозатора 9 см³ дистиллированной воды. Содержимое пробирок встряхивают до полного растворения, после чего выдерживают в течение 15 мин и перемешивают.

От восстановленного как описано выше молока с помощью дозы две параллельные пробы объемом 5 см³ и помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробу в следующем режиме 4000 g, 5 мин. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм PBS-буфера с твином, приготовленного по 8.3.2.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 до плюс 25 °C в течение трех часов.

8.5.1.3 Подготовка проб йогурта, кефира, сметаны, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Доводят температуру представленного образца от плюс 20 до плюс 25 °C, выдерживая его при комнатной температуре.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 2 параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навеске приливают небольшими порциями по 10-20 см³ дистиллированную воду, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

При наличии в образце йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают. Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают.

От образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки с пробами добавляют отмеренные дозатором 125 мм³ реагента для очистки и перемешивают на вортексе в течение 30 с на максимальной скорости.

Пробирки центрифугируют в следующем режиме 4000 g, 5 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 100 мм^3 из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 . В пробирки дозатором добавляют 344 мм^3 буфера для доведения проб № 1 и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 до плюс 25°C в течение трех часов.

8.5.1.4 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Образец масла, охлажденный до температуры не больше минус 10°C , измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца до плюс 20°C выдерживая его при комнатной температуре. Образец творога тщательно гомогенизируют, избегая отделения сыворотки.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой $1,00 \text{ г}$, взвешенные с погрешностью $0,01 \text{ г}$. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 4 см^3 PBS-буфера с твином, приготовленного по 8.3.2.2. Пробирки с пробами выдерживают на водяной бане при температуре от 50 до 55°C до расплавления пробы, но не менее двух минут.

Затем пробирки с пробами интенсивно встряхивают на шейкере или вручную в течение 5 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме 4000 g , 10 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 1 см^3 из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира, и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 .

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 до плюс 25°C в течение трех часов.

8.5.1.5 Получение разбавленных растворов проб

При получении результатов измерений проб больших, чем значение, соответствующее верхней границе диапазона градуировки ($10,0 \text{ нг/см}^3$), согласно 10.2 проводят разбавление приготовленных по 8.5.1.1-8.5.1.4 растворов проб следующими растворителями:

- пробы масла сливочного, сыра, творога, молока, сухого молока - PBS-буфер с твином;

- пробы йогурта, кефира, сметаны, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки - буфер для доведения проб № 1.

Разбавлению должны подвергаться свежеприготовленные растворы проб.

При проведении разбавления отобранные дозатором аликвоты растворов проб объемом V_a , мм³, переносят в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³ или 10 см³. В пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом V_b , мм³, и перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Коэффициент разбавления K рассчитывается по формуле (8)

$$K = \frac{V_a + V_b}{V_a}, \quad (8)$$

Величины V_a , V_b должны соответствовать условию (6), и выбираются таким образом, чтобы концентрация стрептомицина в разбавленном растворе пробы находилась в диапазоне градуировки.

$$500 \leq (V_b + V_a) \leq 1000 \quad (9)$$

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

8.5.2 Подготовка проб при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»

8.5.2.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Образец молока переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³ в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, и тщательно перемешивают на вортексе.

От образца молока с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробы в следующем режиме 10 °С, 4000 g, 5 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10 – 15 мин, охлаждая пробы до температуры от плюс 7 до плюс 8 °С, контролируя температуру термометром. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм^3 и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5 - 2 \text{ см}^3$. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм^3 фосфатного буферного раствора с твином, приготовленного по 8.3.3.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 до плюс 25 °C в течение трех часов.

8.5.2.2 Подготовка проб сухого молока, сухих молочные смесей для детского питания

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс 25 °C, выдерживая его при комнатной температуре.

В мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают две параллельные навески образца, взвешенные с погрешностью не более 0,1 г. Массы навесок сухого молока в зависимости от содержания жира, составляют:

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;
- 10,0 г сухого молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше.

Массы навесок сухих молочных смесей для детского питания рассчитывают, используя отношение массы смеси к объему воды, указанное в инструкции производителя.

Затем в колбы с навесками порциями по $10 - 20 \text{ см}^3$ приливают нагретую до температуры 40°C дистиллированную воду объемом $80 - 90 \text{ см}^3$, перемешивая содержимое до полного растворения образца. После растворения навесок растворы в колбах охлаждают до температуры окружающей среды, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Пробы выдерживают при температуре от плюс 20 до плюс 25 °C в течение 15 мин.

От каждой из восстановленных как описано выше проб с помощью дозатора отбирают аликвоту объемом 10 см^3 и помещают их в пробирки для центрифугирования 15 см^3 . Центрифугируют пробы в следующем режиме 10 °C, 4000 g, 5 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10 – 15 мин, охлаждая пробы до температуры от плюс 7 до плюс 8 °C, контролируя температуру термометром. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после

центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренных проб объемом 100 мм^3 и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5 - 2 \text{ см}^3$. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм^3 фосфатного буферного раствора с твином, приготовленного по 8.3.3.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 до плюс 25 °C в течение трех часов.

8.5.2.3 Подготовка проб сгущенного молока

Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс 25 °C, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

Отбирают две параллельные навески массой 12,5 г, взвешенные с погрешностью не более 0,1 г, и помещают в мерные колбы вместимостью 50 см^3 . В мерные колбы с навесками приливают отмеренную дозатором дистиллированную воду порциями по $10 - 20 \text{ см}^3$, нагретую до 40 °C, перемешивая содержимое колб вращением до полного растворения навески. После охлаждения до температуры окружающей среды растворы в колбах доводят до метки дистиллированной водой. Из каждой колбы отбирают дозатором аликвоты объемом 10 см^3 и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 .

Пробирки с аликвотами центрифугируют в следующем режиме 10 °C, 4000 g, 5 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10 – 15 мин, охлаждая пробы до температуры от плюс 7 до плюс 8 °C, контролируя температуру термометром. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Аликвоты объемом 100 мм^3 обезжиренных разбавленных проб, полученных как описано выше, отбирают дозатором и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5 - 2 \text{ см}^3$ (перед тем как вылить раствор в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления возможных следов жира). В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм^3 фосфатного буферного раствора с твином, приготовленного по 8.3.3.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

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

8.5.1.4 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Образец масла, охлажденный до температуры не больше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца от плюс 20 °С выдерживая его при комнатной температуре. Образец творога тщательно гомогенизируют, избегая отделения сыворотки.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 4 см³ фосфатного буферного раствора с твином, приготовленного по 8.3.3.2. Пробирки с пробами выдерживают на водяной бане при температуре (52 ± 2) °С до расплавления пробы, но не менее 2 мин.

Затем пробирки с пробами интенсивно встряхивают на шейкере в течение 5 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме 4000 g, 10 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 1 см³ из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в неё верхнего слоя жира, и переносят их в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 см³

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

8.5.1.5 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, субпродуктов (печени), консервов мясных и мясорастительных, яиц

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, после чего тщательно гомогенизируют их, избегая разделения фаз.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 4 см³ фосфатного буферного раствора, приготовленного по 8.3.3.1.

Пробирки с пробами интенсивно перемешивают при переворачивании на ротаторе в течение 30 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме 4000 g, 10 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом $0,2\text{ см}^3$ из надосадочного слоя, избегая попадания в неё верхнего слоя жира и частиц осадка, и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью от 1 до 5 см^3 или в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5 - 2\text{ см}^3$. В пробирки с аликвотами вносят по $0,2\text{ см}^3$ фосфатного буферного раствора, приготовленного по 8.3.3.1, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 до плюс $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение трех часов.

8.5.1.6 Подготовка проб сала, в т.ч. шпика, жиров животных, субпродуктов (почек)

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, выдерживая его при температуре окружающей среды, после чего тщательно гомогенизируют их с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 0,50 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором $4,5\text{ см}^3$ экстракционного буферного раствора, приготовленного по 8.3.3.3.

Пробирки с пробами интенсивно перемешивают на вортексе в течение 10 мин или при переворачивании на ротаторе в течение 30 мин. Из каждой пробирки дозатором отбирают аликвоты объемом $1,2\text{ см}^3$, и переносят их в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5 - 2\text{ см}^3$. Пробирки с аликвотами центрифугируют в следующем режиме 4000 g, 5 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом $0,5\text{ см}^3$ из надосадочного слоя, избегая попадания в неё верхнего слоя жира и частиц осадка, и переносят их в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5 - 2\text{ см}^3$. Пробирки помещают на водяную баню или в инкубатор (сушильный шкаф) и инкубируют при температуре $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 3 мин, охлаждают до температуры окружающей среды, после чего центрифугируют в следующем режиме 4000 g, 5 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом $0,2\text{ см}^3$ из надосадочного слоя, избегая попадания в неё верхнего слоя жира и частиц осадка, и переносят их в

стеклянные пробирки вместимостью от 1 до 5 см³ или в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 см³. В пробирки с аликвотами вносят по 5 мм³ буферного раствора для доведения проб и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

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

8.5.2.7 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1. Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, после чего его тщательно перемешивают вручную.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,0 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 19 см³ экстракционного буферного раствора, приготовленного по 8.3.3.3. Пробирки с пробами выдерживают в течение 10 мин на водяной бане (в термостате) при температуре 37 °С и затем перемешивают на вортексе в течение 10 мин или при переворачивании на ротаторе в течение 30 мин. Пробирки охлаждают до температуры окружающей среды.

Из каждой пробирки дозатором отбирают аликвоты объемом 0,5 см³, и переносят их в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 см³. Пробирки с аликвотами центрифугируют в следующем режиме 4000 g, 5 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 0,2 см³ из надосадочного слоя и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью от 1 до 5 см³ или пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 см³. В пробирки с аликвотами вносят по 5 мм³ буферного раствора для доведения проб и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

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

8.5.2.8 Подготовка проб молочной сыворотки, сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны, коктейлей на молочной основе, мороженого

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 8.1.

От образца йогурта или мороженого предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают. Доводят температуру образца от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, и тщательно перемешивают. При необходимости для обеспечения однородности применяется гомогенизатор.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 2 параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навеске приливают небольшими порциями по 10-20 см³ дистиллированную воду объемом 80 – 90 см³, перемешивая содержимое вращением колбы до полного образца. После растворения навесок растворы доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Пробы выдерживают при температуре окружающей среды в течение 15 мин.

От подготовленных, как описано выше. Образцов йогурта, кефира, сметаны, коктейлей на молочной основе, мороженого отбирают по две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, молочной сыворотки и восстановленной как выше описано, сухой молочной сыворотки – по две параллельные аликвоты объемом 1,0 см³, и переносят их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором по 125 мм³ экстракционного буферного раствора А, отмеренного дозатором, и перемешивают на вортексе в течение 30 с на максимальной скорости.

Пробирки центрифугируют в следующем режиме 4000 g, 5 мин. Отбирают дозатором аликвоты объемом 100 мм³ из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³. В пробирки дозатором добавляют 344 мм³ экстракционного буферного раствора В и тщательно перемешивают на вортексе.

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

8.5.2.9 Получение разбавленных растворов проб

При получении результатов измерений проб больших, чем значение, соответствующее верхней границе диапазона градуировки (15,0 нг/см³), согласно п. 10.2 проводят разбавление приготовленных по 8.5.2.1-8.5.2.8 растворов проб следующими растворителями:

– пробы молока, сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, сгущенного молока, сыра, сливочного масла. Творога – фосфатным буферным раствором с твином, приготовленным по 8.3.3.2;

– пробы мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, печени, консервов мясных и мясорастительных, яиц – фосфатным буферным раствором, приготовленным по 8.3.3.1;

– пробы животных жиров, сала, шпика, почек, меда, йогурта, кефира, сметаны, коктейлей на молочной основе, мороженого, молочной сыворотки, сухой молочной сыворотки – дистиллированной водой.

Разбавлению должны подвергаться свежеприготовленные растворы проб.

При проведении разбавления отобранные дозатором аликвоты растворов проб объемом V_a , мм³, переносят в стеклянные пробирки вместимостью от 1 см³ до 5 см³. В пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом V_b , мм³, и перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Коэффициент разбавления K рассчитывается по формуле (10)

$$K = \frac{V_a + V_b}{V_a}, \quad (10)$$

Величины V_a , V_b должны соответствовать условию (11), и выбираются таким образом, чтобы концентрация стрептомицина в разбавленном растворе пробы находилась в диапазоне градуировки.

$$500 \leq (V_b + V_a) \leq 1000 \quad (11)$$

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

9 ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

9.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с 8.5. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с 8.4.

9.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа

9.2.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно 8.4.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 50 мм³ каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов:

– 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 нг/см³ (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»);

– 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 15,0 нг/см³ (при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»).

Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 50 мм^3 двух параллельных проб каждого образца.

9.2.2 Добавление антител

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором:

- по 100 мм^3 раствора антител № 1 (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»);
- по 100 мм^3 раствора антител к стрептомицину (при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»).

Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

9.2.3 Инкубация планшета

Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 до плюс 25°C и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 мин в помещении при условиях, указанных в разделе 7.1.

9.2.4 Промывка планшета

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении). Выливают содержимое лунок планшета путем его резкого переворачивания. Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 промывочного раствора, приготовленного по 8.4.3, и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки - от 3 до 4, объем заливаемого моющего раствора - 250 мм^3 .

После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого сухим листом фильтровальной бумаги.

9.2.5 Добавление конъюгата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют:

- по 150 мм^3 конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготовленного по 8.4.4 (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»);
- по 150 мм^3 конъюгата (при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»).

После добавления конъюгата аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

9.2.6 Инкубация планшета

Сразу же после добавления конъюгата антител с пероксидазой № 2 планшет помещают в инкубатор при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

9.2.7 Промывка планшета

Промывают планшет в соответствии с 9.2.4.

9.2.8 Добавление ТМБ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТМБ-субстрата. Отсчет времени инкубации начинают сразу же после:

- добавления ТМБ-субстрата во все лунки при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»;
- добавления ТМБ-субстрата в первую лунку при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин».

Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

НЕ ДОПУСКАЕТСЯ выливать обратно в оригинальный флакон остатки субстрата во избежание его контаминации.

9.2.9 Инкубация планшета

Планшет помещают в инкубатор при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С и инкубируют в течение 15 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 15 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.1.

9.2.10 Завершение реакции окрашивания

Сразу же после окончания времени инкубации в лунки планшета добавляют по 100 мм³ стоп-реагента, отмеренных дозатором, и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

9.2.11 Измерение оптической плотности

Немедленно после перемешивания вытирают микрофибровой салфеткой нижнюю наружную поверхность лунок планшета и измеряют оптическую плотность лунок планшета с помощью автоматического микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

10 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

10.1 Расчет массовой концентрации

Шаблон «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System» (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина») и шаблон на базе Microsoft Office Excel «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик – стрептомицин» (при использовании набора реагентов «ИФА-антибиотик – стрептомицин»), далее «шаблон» производит обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью интерфейса шаблона.

Шаблон выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B/B_0 от натурального логарифма концентрации стрептомицина вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (12)$$

где B – оптическая плотность раствора стрептомицина;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией стрептомицина 0,00 нг/см³;

C – концентрация стрептомицина в растворе, нг/см³.

a, b – коэффициенты линейной регрессии.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью МНК на основании пар значений $B_i/B_0, \ln C$, полученных для пяти градуировочных растворов, где ($i=2 \dots 6$), C_i – концентрация i -го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум значениям оптической плотности параллельных измерений i -го градуировочного раствора.

Массовая концентрация стрептомицина в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле (13)

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \quad (13)$$

где X – концентрация стрептомицина в пробе, мкг/кг:

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, имеющий следующие значения:

10 – для мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных, яиц, сала, в т.ч. шпика, жиров животных;

20 – для меда, сгущенного молока;

5 – для остальных видов продукции согласно области применения, указанной в разделе 1.

При получении результатов измерений проб выше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки (10 нг/см³ при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина», 15,0 нг/см³ при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»), выполняются действия согласно 10.2.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по 10.3.

$$\bar{x} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (14)$$

где X_1 , X_2 – результаты двух измерений массовой концентрации стрептомицина в параллельных пробах, мкг/кг.

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений, то дается односторонняя оценка массовой концентрации стрептомицина в образце с использованием предела измерения согласно 11.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, то дается односторонняя оценка массовой концентрации стрептомицина в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно 11.3.

10.2 Определение массовой концентрации стрептомицина при получении результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки

При получении результатов измерений проб больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки, проводят разбавление растворов проб согласно 8.5.1.5 и 8.5.2.9.

В этом случае при обработке результатов измерений массовой концентрации стрептомицина в вышеупомянутых пробах при расчете по формуле (13) для разбавленных растворов проб в качестве фактора разбавления задается значение, рассчитанное по формуле (15)

$$F = 5 \cdot K, \quad (15)$$

где K – коэффициент разбавления, рассчитываемый по формуле (8)

F – значение фактора разбавления, указанное в п. 10.1.

10.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Рассчитывают расхождение между результатами измерений параллельных проб одного образца $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости r_{abs} . Если выполняется условие (16)

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (16)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (14).

Абсолютное значение предела повторяемости r_{abs} , мкг/кг, рассчитывают по формуле (17)

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (17)$$

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений параллельных проб одного образца, мкг/кг;

r – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблице 3, %.

При невыполнении условия (16) проводят повторные измерения согласно разделу 9.

11 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

11.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(X)), \text{ мкг/кг}$$

при доверительной вероятности $P = 0,95$, $K=2$

где $\bar{X}$ – результат измерений, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 10;

$U(X)$ – расширенная неопределенность результатов измерений, мкг/кг.

Расширенную неопределенность результата измерений $U(X)$, мкг/кг, рассчитывают по формуле (18)

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (18)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с методикой измерений, %, приведенная в таблице 2.

При необходимости может быть проведена оценка расширенной неопределенности измерений, выполняемых в соответствии с данной методикой измерений при ее реализации в конкретной лаборатории.

11.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки концентрации стрептомицина с использованием предела измерения

Если конечный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерения X_{LQ} , указанный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации стрептомицина в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг

$$\text{менее } X_{LQ},$$

где X_{LQ} – значение предела измерений, приведенное выше.

11.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации стрептомицина с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если конечный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , указанное в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации стрептомицина в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг

$$\text{более } X_{HL},$$

где X_{HL} – значение верхней границы диапазона измерений, приведенное в разделе 1.

12 КОНТРОЛЬ ТОЧНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Контроль качества проведения измерений выполняется с периодичностью, установленной системой менеджмента качества в лаборатории, но обязательно:

- при внедрении методики;
- при появлении факторов, влияющих на стабильность процесса по результатам анализа контрольных карт;
- при значимых изменениях в условиях измерений (другая партия реагентов, новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.);
- при любых выявленных несоответствиях в работе лаборатории, применительно к методике выполнения измерений.

12.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации стрептомицина при расчете конечного результата

измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с 10.3.

12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами оператор-время проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\bar{X}_1, \bar{X}_2$ согласно разделу 9, варьируя факторы промежуточной прецизионности (оператор, время) и обеспечивая контроль повторяемости по 10.3. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\bar{X}_1, \bar{X}_2$

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (19)$$

при их соответствии условию (20)

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abc} \quad (20)$$

где CD_{abc} – абсолютное значение критической разности, мг/кг, рассчитываемое по формуле (21)

$$CD_{abc} = 0,01 \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (21)$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 5.

12.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 9 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по 10.3.

Рассчитывают среднее арифметическое значение $\bar{\bar{X}}$, мкг/кг, результатов измерений двух лабораторий $\bar{X}_1, \bar{X}_2$ соответственно

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (22)$$

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами измерений $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$, полученными в двух лабораториях, значение, которого сравнивают с абсолютным значением критической разности CD_R . Если выполняется условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abc}, \quad (23)$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\bar{\bar{X}}$, рассчитанное по формуле (22), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Абсолютное значение критической разности CD_R , мкг/кг, рассчитывают по формуле (24)

$$CD_R = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (24)$$

где $\bar{\bar{X}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений двух лабораторий, мкг/кг;

k – коэффициент, равный 1,2;

CD – относительное значение критической разности, % приведенное в таблице 5.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 6 СТБ ИСО 5725-6.

Таблица 5 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
При использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»			
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, сухая молочная сыворотка, масло сливочное, сыр, творог, молочная сыворотка, йогурт, кефир, сметана	10	24	19
При использовании набора реагентов «ИФА антибиотик – стрептомицин»			
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, йогурт, кефир, сметана, сухую молочную сыворотку, молочную сыворотку, коктейли на молочной основе, мороженое, творог, масло сливочное, сыр, жир, сало, в т.ч. шпик, субпродукты (почки)	17	19	17
Сгущенное молоко, мед, мясо, мясные продукты, яйца, субпродукты (печень), консервы мясные и мясорастительные	7	22	19

12.4 Контроль правильности

Контроль правильности определения массовой концентрации стрептомицина производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением концентрации вещества (рабочая проба с добавкой).

Контроль правильности проводится с использованием добавок стрептомицина. Неопределенность аттестованного значения массовой концентрации стрептомицина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

12.4.1 Образцы контроля, представляющие собой рабочие пробы с добавкой

Данные образцы для контроля представляют собой навеску пробы, массовая концентрация стрептомицина в которой менее предела измерения данной методики измерений, в которую внесена добавка раствора стрептомицина. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации стрептомицина X_{am} , мкг/кг, в пробе с добавкой рассчитывается по формуле (25)

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (25)$$

где C_{ST} – концентрация стрептомицина в растворе, нг/см³;

V_{ST} – объем добавляемого раствора, см;

m – масса навески пробы, г.

П р и м е ч а н и е – Принимается, что для сырого, пастеризованного, стерилизованного молока масса m численно равна объему аликвоты, см³.

Величина массовой концентрации стрептомицина в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Значение концентрации в растворе для добавки должно обеспечивать возможность внесения добавки стрептомицина во всем диапазоне измерений МИ. Относительная стандартная неопределенность массовой концентрации стрептомицина в растворе для добавки должна быть не более 3 %, относительная стандартная неопределенность добавляемого объема раствора – не более 1,5 %.

12.4.2 Проведение контрольной процедуры

При проведении контрольной процедуры для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного молока сухого и масла сливочного при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» получают серию из 6 результатов измерения ОК в условиях повторяемости в соответствии с требованиями раздела 9. При проведении контрольной процедуры в остальных случаях получают два результата измерений параллельных проб ОК в соответствии с требованиями раздела 9.

За результат контрольного измерения принимают:

1 При проведении контрольной процедуры для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного молока сухого и масла сливочного при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» результат измерения массовой доли стрептомицина, рассчитанный по формуле (26), при выполнении условия повторяемости по 10.3 с использованием вместо относительного предела повторяемости r , приведенного в таблице 5, значения $1,43 \cdot r$;

2 При проведении контрольной процедуры в остальных случаях – результат измерения массовой доли стрептомицина в ОК, рассчитанный по формуле (22) при выполнении условия повторяемости по 12.1

$$\bar{X}_k = \frac{\sum_{i=1}^6 X_i}{6}, \quad (26)$$

где X_i – i результат измерений ОК, мкг/кг.

Критерием приемлемости является условие (27)

$$|\bar{X}_k - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \bar{X}_k, \quad (27)$$

где $K_{отн}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 5;

X_{am} – рассчитанное значение массовой концентрации стрептомицина в ОК, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (27) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

12.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)

С помощью КК контролируют следующие показатели точности:

- повторяемость (R-карта или карта размахов);
- наличие смещения или правильность (Recovery-карта).

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [3] и СТБ ИСО 5725-6, раздел 7.

Для проверки стабильности соответствия результатов испытаний показателям повторяемости, установленным данной методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для построения КК используют показатели повторяемости в соответствии с таблицей 1.

П р и м е ч а н и е – При применении КК в течение длительного времени, для расчета границ КК могут быть использованы данные измерений, накопленные в процессе ведения и обработки КК. Однако соответствие результатов измерений требованиям данной методики

может быть заявлено только в том случае, если показатель повторяемости, рассчитанный по накопленным лабораторией данным, статистически не превышает установленных методикой значений.

Для построения и ведения R-карт в качестве образцов для контроля (ОК) могут использоваться рабочие образцы.

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками раствора стрептомицина, приготовленного из бензилстрептомицина калиевой или натриевой соли в соответствии с прилагаемой инструкцией. Предварительно установленная массовая концентрация стрептомицина в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной методики измерений. Рекомендуется вносить добавку стрептомицина в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

12.5.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

Центральная линия

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (28)$$

где σ_r – относительное СКО повторяемости, %, приведенное в таблице 1.

Предупреждающие границы

$$UCL = D_2' \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r, \quad (29)$$

Границы регулирования

$$UCL = D_2 - \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r, \quad (30)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных X_1 , X_2 при выполнении испытаний ОК в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой, расчета фактических относительных значений размаха W по формуле (31), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (31)$$

где X_1 , X_2 – значение результатов измерений в условиях повторяемости.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5], пунктом 7. Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формулам (31), (32)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^n W_i / N}{d_2}, \quad (32)$$

где N – общее число измерений (точек) на КК, для получения значений центральной линии и границ необходимо, чтобы $= 15 \dots 20$;

d_2 – коэффициент, $d_2 = 1.128$.

12.5.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

Центральная линия

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{j=1}^N Rec_i}{N}, \quad (33)$$

где N – количество измерений для расчета значений центральной линии и границ КК;

Rec_i – значение извлечения (Recovery), %, рассчитываемое по результатам i -го измерения пробы с добавкой стрептомицина, по формуле (34)

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \quad (34)$$

где X_i – массовая концентрация стрептомицина в пробе с добавкой, полученное для i -го измерения, мкг/кг;

X_{exp} – рассчитанное значение массовой концентрации стрептомицина в пробе с добавкой, мкг/кг.

Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC}, \quad (35)$$

Границы регулирования

$$UCL = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC}, \quad (36)$$

где S_{REC} – стандартное отклонение извлечения, %, рассчитываемое по формуле (37)

$$S_{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}. \quad (37)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений X_i при выполнении испытаний образцов контроля в соответствии с методикой измерений, расчета фактических значений коэффициента извлечения Rec_i по формуле (34), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5], пунктом 7.

БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, V.J. Barwick and S.L.R. Ellison, LGC/VAM/1998/088
- [2] ISO 21748:2010 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения
- [3] ТУ ВУ 100231303.011-2002 Секундомер электронный «Интеграл С-01»
- [4] ТУ ВУ 191218537.004-2015 Набор реагентов для определения содержания антибиотика стрептомицина в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа «ИФА антибиотик – стрептомицин»
- [5] ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.